

*Einfluss von Stressfaktoren auf die
Etablierung der prokaryotischen
Gemeinschaft und den Metabolismus in
biotechnischen, anaeroben Prozessen*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT)
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Nicolas Weithmann

aus Ulm

Bayreuth, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2013 bis April 2018 in Bayreuth am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik unter Betreuung von Frau Professorin Dr. Ruth Freitag angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 11.04.2018

Zulassung durch das Leitungsgremium: 16.04.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 12.12.2018

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Ruth Freitag	(Gutachterin)
Prof. Dr. Harold Drake	(Gutachter)
Prof. Dr. Dirk Schüler	(Vorsitz)
PD. Dr. Alfons Weig	

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Freitag, für die Ermöglichung der Promotion in einem fördernden Umfeld. Ein Projekt mit vielen Partnern und stets neuen Methoden und Herausforderungen erfordert ein hohes Maß an Flexibilität. Es war schön, dass ich auch neben den Projektbesprechungen stets ein offenes Ohr gefunden habe, wenn es darum ging, Ideen, Ansätze und Umsetzungen zu diskutieren. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit bei der Umsetzung, die teilweise weit über die ursprüngliche Idee hinausging.

Die Promotion war in diesem Umfang nur durch die Zusammenarbeit mit Partnern möglich, die durch Expertisen auf ihrem Gebiet wertvolle Beiträge beisteuerten. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Weig, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Erstellung von Populationsanalysen, der Unterstützung bei der statistischen Auswertung und viele anregende Diskussionen. Frau Dr. Jérôme und Herrn Dr. Hilbrig danke ich für den fachlichen Austausch und die Zusammenarbeit am Lehrstuhl. Zudem danke ich Herrn Prof. Laforsch, Dr. Martin Löder, Julia Mölders und Sarah Piel für die Zusammenarbeit im Mikroplastik-Projekt und der damit verbundenen Publikation sowie für die Einweisung in die Polymeranalytik. Ich danke Frau Dr. Reuter und Frau Sonnleitner von der MicrobEnergy GmbH für die Bereitstellung von Proben und Daten sowie für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die Möglichkeit die gewonnenen Erkenntnisse in meiner Dissertation einzubinden. Mein Dank geht auch an Frau Prof. Planer-Friedrich und Herrn Dr. Samer Bachmaier für die Zusammenarbeit im Arsenprojekt. Zudem danke ich Herrn Dr. Ilgen und Herrn Dr. Obst für die Einweisung in die Metall(oid)-Analytik. An dieser Stelle möchte ich mich außerdem bei allen Studenten bedanken, die in Form von Projekt-, Modul- und Abschlussarbeiten beteiligt waren. Das Fundament für die Promotionsarbeit bildeten die zahlreichen Anlagenbetreiber, die mich zuverlässig mit Proben und Betriebsdaten versorgten und mich an ihren Erfahrungen teilhaben ließen. Ihnen sei ebenfalls herzlich gedankt!

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und (ehemaligen) Doktoranden am Lehrstuhl Bioprozesstechnik, die mehr als nur Kollegen geworden sind.

Nicht zuletzt möchte ich den besonderen Menschen aus meinem Umfeld danken, die mich geprägt haben. Hierzu zählen meine Eltern Elisabeth und Gerhard, die mir immer zur Seite standen und meine Lebensgefährtin Luise mit ihrer partnerschaftlichen Unterstützung.

Zusammenfassung

Als Energieträger mit Potential für Power-to-Gas-Applikationen kann Biogas einen entscheidenden Beitrag zu den drängendsten Fragen der Energiewende leisten: Mobilität, Speicherung von Energie und Netzstabilität. Häufig ist die Biogasproduktion finanziell nicht selbsttragend und die Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit wird unterschiedlich bewertet. Wichtige Ansatzpunkte zur Optimierung des Biogasprozesses sind Anlagenflexibilisierung, Systemintegration, Power-to-Gas und die Optimierung der biologischen Prozesse. Als Beitrag hierzu werden in der vorliegenden Arbeit, mit Fokus auf der Anlaufphase, die Entwicklung und Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft aus Biogasprozessen, anhand von Betriebsparametern und Stoffwechselprodukten betrachtet. Darüber hinaus wird der Einfluss verschiedener Fütterungsintervalle zur Flexibilisierung, der Einfluss von Metalloiden aus dem Gärsubstrat auf den Biogasprozess, sowie die Relevanz des Austrags von Mikroplastikpartikeln in die Umwelt untersucht.

Die Anlaufphase einer Biogasanlage wurde als hochdynamischer Entwicklungsprozess erwartet, der nach Etablierung der mikrobiellen Gemeinschaft zu einem stabilen Prozess führt und wichtige Erkenntnisse für weitere Forschungsarbeiten zur Prozessoptimierung liefert. Die Anlaufphase wurde an einer zweistufigen Anlage im Produktionsmaßstab über den Zeitraum von 240 Tagen verfolgt. Es konnte mittels Automatisierter Ribosomaler intergenischer Spacer Analyse (ARISA) gezeigt werden, dass sich der Untersuchungszeitraum in fünf deutlich getrennte Entwicklungsphasen unterteilt. Trotz anhaltend hoher Dynamik der mikrobiellen Population etablierte sich mit Erreichen der Endtemperatur nach ca. 30 Tagen eine stabile Gasproduktion. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich die mikrobielle Population zunehmend und die Reaktionen auf veränderte Bedingungen nahmen ab. Die Untersuchung mittels Next-Generation-Sequenzierung (NGS) zeigte, dass die dominierenden Bakterien den Klassen *Clostridia* mit den Ordnungen *Clostridiales* und *MBA08* sowie der Klasse *Bacteroidia* mit der Ordnung *Bacteroidales* entstammen.

Die flexibilisierte Substratgabe wurde erprobt, um die Biogasproduktion an der Energienachfrage zu orientieren, Substrat und Speicherkapazität einzusparen, sowie günstige Einspeisebedingungen zu nutzen. Es wurde erwartet, dass variierende Fütterungsintervalle einen Prozess anstoßen, der über die Zeit zu einer Anpassung der Mikrobiologie führt. Proben der MicrobEnergy GmbH aus einem 200 L Reaktor, in dem über 700 Tage verschiedene Kombinationen aus Fütterungsintervallen und Raumbelastung erprobt wurden, wurden mit den Prozessparametern, Stoffwechselprodukten und der mikrobiellen Entwicklung (NGS)

verknüpft. Es etablierte sich ein stabiler Prozess mit weitgehend konstantem CH₄-Niveau während der Fütterungsphasen, der durch Substratminimierung eine Reduktion der Gasproduktion von bis zu 80 % innerhalb eines Tages ermöglichte. Wichtige Indikatorparameter für einen funktionierenden Prozess, wie Fettsäure- und Wasserstoffkonzentration, wiesen vor allem in der ersten Hälfte des Versuchs wiederholt erhöhte Werte auf, die sich jeweils nach spätestens drei Tagen wieder normalisierten. In Folge der Flexibilisierung erfolgte eine Neuordnung der Gemeinschaft, die über die letzten 160 Tage, trotz erneuter Änderung des Fütterungsintervalls und der Substratzusammensetzung, weitestgehend konstant blieb. Die dominanten Archaeen stammten aus der Ordnung *Methanosarcinales*. Im Laufe des Versuches lösten Vertreter der Klasse *Methanosaetaceae* Vertreter der Klasse *Methanosarcinaceae* ab.

Die Hydrierung und Methylierung verschiedener Metalloide durch Mikroorganismen, ist auch unter anaeroben Bedingungen belegt. Es wurde vermutet, dass Metalloide, die durch das Gärsubstrat in Biogasanlagen gelangen und dort auf eine hochaktive mikrobielle Gemeinschaft treffen, Auswirkungen auf den Prozess und die entstehenden Produkte haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in allen 15 untersuchten Biogas- und Kläranlagen Metalloide, beispielsweise Arsenverbindungen, nachgewiesen werden. Die Auswirkungen auf den Prozess wurden anhand der Überführung auf einen Laborreaktor untersucht, indem Parallelansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen (unbehandelt, 30 µM und 60 µM) von Arsen (As) versetzt wurden. In der Folge wurden für 14 Tage Arsenspezies in der Flüssig- und Gasphase analysiert und in Zusammenhang mit dem produzierten Gasvolumen, CH₄-Gehalt, Essigsäure sowie der mikrobiellen Entwicklung (ARISA) beobachtet. Die Arsengabe führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Prozesses, mit einem Einbruch der Gasproduktion sowie der Akkumulation von Essigsäure. Sämtliches As(III) wurde zu As(V) umgewandelt. Zudem fand eine Methylierung und im weiteren Verlauf auch eine Dimethylierung statt. In der Gasphase wurde ausschließlich Arsin (AsH₃) sowie einfach methyliertes Arsin (MeAsH₂) detektiert. Die mikrobielle Zusammensetzung veränderte sich mit der Gabe von Arsen nicht.

Die Belastung durch Polymere, die in die Umwelt geraten, rückt immer weiter in den Fokus der Öffentlichkeit. Zunehmend wird ersichtlich, dass vor allem Kleinstpartikel (Mikroplastik) ubiquitär in der Umwelt vorkommen und bereits in die Nahrungskette eingedrungen sind. Es wurde angenommen, dass organische Dünger aus der Vergärung oder Kompostierung von Bioabfällen eine signifikante Eintragsquelle für Mikroplastik in die Umwelt darstellen. Um dies zu bewerten, wurden aus einer Kompostieranlage sowie aus 14 verschiedenen Biogasanlagen

Partikel isoliert, quantifiziert und qualitativ bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Anlagen aus landwirtschaftlichen Betrieben weitgehend unbelastet sind. In Anlagen zur Verwertung von biogenen Abfallstoffen wurden deutlich höhere Partikelzahlen festgestellt. Die größte Fraktion entfällt auf Partikel der Größenordnung 2-5 mm. Am häufigsten kommen Polymere auf Styrenbasis vor. Die meisten Partikel wurden in einer Anlage zur anaeroben Vergärung von gewerblichen Lebensmittelabfällen mit einer Anzahl von 752 Partikeln kg^{-1} TS nachgewiesen.

Weiterführende Untersuchungen könnten zeigen, ob der Flexibilisierungsprozess durch den Einsatz von Reststoffen nachhaltiger gestaltet werden kann. Das Schadpotential volatiler Arsenverbindungen für weiterverwertende Prozesse kann mittels Sensoren zur Katalysator-Charakterisierung untersucht werden. Das Aufnahmepotential von Mikroplastik sollte durch die Inkubation mit Tierzelllinien oder anhand von Gewebepräparaten untersucht werden.

Abstract

Biogas, a renewable energy resource with potential for Power-to-gas applications, can contribute to the most urgent issues of the energy transition: mobility, energy storage and grid stability. However, the production of biogas is often uneconomic and the sustainability has been discussed. Approaches for process improvement include flexibility, system integration, Power-to-gas and optimization of biological processes. In the present work, the development and dynamics of microbial communities in biogas plants have been analysed, considering process parameters and metabolic products, while focusing on the start-up phase. Furthermore, the influence of different flexible feeding strategies and the influence of metalloids derived from substrates on the biogas process as well as the emission of microplastic particles to the environment have been investigated.

The establishment of the microbial community during the start-up phase was examined. This phase was expected to be highly dynamic before reaching a stable state. The results were assumed to be of high impact for process optimization. The start-up-phase was examined in a two-staged plant in production scale for a period of 240 days. It was possible to divide Automated Ribosomal Intergenetic Spacer Analysis (ARISA) derived fragment profiles into five clearly separated phases. Despite persistent dynamics of the microbial population, establishment of a constant gas flow was achieved after reaching final process temperature at approximately 30 days. In later stages, an increasing stabilization was observed and the reaction of the microbial community on changing conditions decreased. Examination by Next-Generation-Sequencing showed that dominating classes of bacteria were *Clostridia* with orders *Clostridiales* and *MBA08*, and *Bacteroidia* with the order *Bacteroidales*.

Enabling a demand-driven biogas production can save substrates and storage capacity, while enabling production of electricity at times with lucrative tariffs. For these reasons, effects of different flexible feeding regimes were tested. The variation of feeding intervals was expected to initiate a process of adaptation of the microbial community. The samples for examination were provided by MicrobEnergy GmbH. Varying combinations of feeding intervals and volume loads carried out in a 200 L reactor for 700 days were analysed, considering process parameters, metabolic products and microbial dynamics (NGS). It was shown that a mainly stable process was established, resulting in a constant CH₄ level during feeding phases. Minimalized feeding amounts resulted in a reduced gas production of up to 80 % within one day. Parameters indicating stable digestion processes, e.g. volatile fatty acids and hydrogen, showed high concentrations in the first half of the experiment. However, normalised values were reached

within three days. As a response to the flexible feeding, a reorganization of the population was observed, leading to an almost constant community in the last 160 days of the experiment. Further changed feeding intervals with varying substrate compositions did not lead to further significant changes in the community structure. Dominating archaea were of the order *Methanosarcinales*. During the experiment, representatives from the class *Methanosaetaceae* replaced representatives from the class *Methanosarcinaceae*.

Hydration and methylation of metalloids by microorganisms has been observed, even under anaerobic conditions. Metalloids introduced to a biogas plant are met by a highly active microbial community. It was assumed that this would have an impact on the biogas process and the resulting products. Metalloids were detected in all 15 investigated biogas and sewage plants. Effects on the process were analysed by transfer to laboratory scale and adding arsenic in different concentrations to parallel approaches (no addition, 30 μM and 60 μM). In the following 14 days, arsenic species in the liquid and gaseous phase were analysed and compared to produced gas volumes, CH_4 content, acetic acid and the microbial development (ARISA). The addition of arsenic led to a concentration-dependent inhibition of the gas production and an accumulation of acetic acid. All As(III) changed to As(V), and additional methylation took place. In a later state, demethylation was observed. In the gaseous phase, solely arsine (AsH_3) and methylated arsine (MeAsH_2) was detected. No change of the microbial composition in consequence of the addition of arsenic has been observed.

Lately, polymer particles emitted to the environment have been an object of public interest. It has been shown that small particles (microplastics) are ubiquitous in the environment and have already entered the food chain. It was assumed that organic fertilizers derived from aerobic or anaerobic digestion act as vectors for microplastic to the environment. To evaluate, microplastic particles from one composting and 14 biogas plants were isolated, quantified and specified. While agricultural plants were almost free of microplastic particles, plants utilizing organic waste were contaminated at a considerate level. Most particles were styrene-based and of a size between 2-5 μm . Most particles were found in a plant digesting commercial food waste, reaching particle counts of 752 kg^{-1} dry substance.

Further investigations could address the question if residual materials can be used in a demand-driven biogas production, increasing process sustainability. Furthermore, sensors for catalyst characterisation can evaluate the influence of volatile arsenic compounds in a next step. The uptake of microplastic to cells can be investigated by incubation experiments with animal cell lines or tissues.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	XII
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XVII
1. Einleitung	1
Zielsetzung der Arbeit	2
2. Grundlagen	4
2.1 Der anaerobe Abbauprozess	7
2.2 Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften	14
2.2.1 DNA-Extraktion aus Umweltproben	15
2.2.2 DNA-Fingerprinting	16
2.2.3 Sequenzbestimmung	16
2.2.4 Molekulare Quantifizierung	18
2.3 Gängige Reaktortypen	19
2.4 Anlaufphase und Maßstabsverkleinerung	23
2.5 Flexibilisierung	25
2.6 Störstoffe und deren Umweltrelevanz	27
2.6.1 Mikroplastik	27
2.6.2 Metalloide	30
3. Material und Methoden	34
3.1 Laborgeräte	34
3.2 Chemikalien	36
3.3 Software	37
3.4 Oligonukleotide	37
3.5 Laborreaktoren, technische Anlagen und Probennahme	38
3.5.1 Reaktor zur Untersuchung der Anlaufphase	39
3.5.2 Trockenfermentation: Technische Anlage und Modellkonstruktion	40

3.5.3	Anlagen zur Metall(oid)bestimmung	44
3.5.4	Anlagen zur Untersuchung der Mikroplastikbelastung	48
3.5.5	Reaktoren zur Untersuchung der Substratflexibilisierung	53
3.6	Analyse der Prozessparameter	54
3.6.1	Leitfähigkeit und pH-Wert	54
3.6.2	Trockensubstanz	54
3.6.3	FOS / TAC	54
3.6.4	Fettsäure-Analytik	55
3.6.5	Gasanalytik	55
3.6.6	Weitere Parameter	56
3.7	DNA-Extraktion	57
3.7.1	Kommerzielle Kits	57
3.7.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	58
3.7.3	Versuchsspezifische Abweichungen in der Extraktionsmethode	59
3.8	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	60
3.8.1	Herstellung von Plasmidstandards zur Quantifizierung	63
3.8.2	Rückrechnung der Quantifizierung	63
3.9	Automatisierte Ribosomale intergenische Spacer Analyse (ARISA)	64
3.10	Next-Generation Sequenzierung (NGS)	65
3.11	Gesamtmetall(oid)-Konzentrationen und Arsenspezies aus den Rückständen	65
3.11.1	Bestimmung der Gesamtmetall(oid)-Konzentrationen	65
3.11.2	Bestimmung der As-Spezies	66
3.12	Arsenspezifizierung aus der Gasphase	66
4.	Ergebnisse und Diskussion	68
4.1	DNA-Extraktion	68
4.1.1	Kommerzielle Kits und Phenol-Chloroform-Extraktion	69
4.1.2	Säulenaufreinigung	72
4.1.3	Zugabe von Additiven	72

4.2	Untersuchungen der mikrobiellen Population	73
4.3	Anlaufphase einer technischen Biogasanlage	76
4.3.1	Laufparameter der technischen Anlage	76
4.3.2	Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft	81
4.3.3	Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft – NGS-qPCR	87
4.3.4	Zusammenfassung	92
4.4	Dynamik einer Trockenfermentationsanlage	92
4.5	Flexibilisierung der mikrobiellen Gemeinschaft	96
4.5.1	Prozessdynamik	96
4.5.2	Mikrobielle Dynamik	103
4.5.3	Zusammenfassung	108
4.6	Organische Dünger als Eintragsweg für Mikroplastik in die Umwelt	108
4.6.1	Polymerpartikel in landwirtschaftlichen Anlagen	108
4.6.2	Polymerpartikel in Düngern aus organischen Reststoffen	109
4.7	Metall(oid)belastung im Gärprozess	116
4.7.1	Metalloide in technischen Anlagen	116
4.7.2	Speziierung in Flüssig- und Gasphasen technischer Anlagen	118
4.7.3	Performance der Biogassatelliten in Abhängigkeit von der As-Konzentration	121
4.7.4	Mikrobielle Dynamik der Satellitenreaktoren	123
4.7.5	Speziierung in Flüssig- und Gasphasen der Satellitenreaktoren	125
4.7.6	Zusammenfassung	129
5.	Ausblick	131
	Quellenverzeichnis	XVII
	Anhang	XXXVII
	Tabellen und Ergebnisse	XXXVII
	Veröffentlichungen	LXXIII
	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	LXXIV

Abkürzungsverzeichnis

AFS	Atomfluoreszenzspektroskopie
ANOSIM	paarweise statistische Analyse
ARISA	Automatisierte Ribosomale intergenische Spacer Analyse
As	Arsen
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
ATP	Adenosintriphosphat
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
BGA	Biogasanlage
Bi	Bismut
Bp	Basenpaare
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BGA	Zwischen-Gruppen Analyse
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderalbumin)
BHKW	Blockheizkraftwerk
CF	Cryofocusing (Kryofokussierung)
CH ₄	Methan
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA-SH	Coenzym A
CoM-SH	Coenzym M
CoM-S-S-CoB	Heterodisulfid von Coenzym M und Coenzym B
CT	Cryotrap (Kryofalle)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMA	Dimethylarsinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Monomer
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

gDNA	Genomische DNA
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin
KA	Kläranlage
oTS	Organische Trockensubstanz
OTU	Operational taxonomic unit
MMA	Monomethylarsonsäure
MFR	Methanofuran
MS	Massenspektrometrie
PA	Polyamid
PC	Polykarbonat
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCO	Principal Coordinates Analysis (Hauptkoordinatenanalyse)
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
PES	Polysulfon
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PU	Polyurethan
PVC	Polyvinylchlorid
LPM	Landschaftspflegematerial
MPN	Most Probable Number (wahrscheinlichste Anzahl)
MPP	Mikroplastikpartikel
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NGS	Next-Generation Sequenzierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RDP	Ribosomal Database Project
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SAM	S-Adenosylmethionin
SAN	Styrol-Acrylnitril

Sb	Antimon
Se	Selen
SG	SYBR Green
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TCD	Thermal Conductivity Detector
TMA	Trimethylarsin
T-RFLP	Terminaler- Restriktionsfragment- Längenpolymorphismus
TS	Trockensubstanz
VFA	Volatile Fatty Acid (Flüchtige Fettsäure)
VOC	Volatile Organic Compound (Flüchtige organische Verbindung)
λ	Lambda (Wellenlänge)
λ_{\max}	Wellenlänge der maximalen Emission/Absorption

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: A. Volta beim Sammeln von Methan (1777)	4
Abbildung 2: Zusammenspiel der Mikroorganismen beim Abbau organischen Materials	7
Abbildung 3: Dreistufenmodel des anaeroben Abbaus	8
Abbildung 4: Stoffwechselwege der Methanogenese.	13
Abbildung 5: Anwendungen moderner Methoden zur Analyse mikrobieller Diversität	17
Abbildung 6: MCR I und MCR II Operons verschiedener methanogener Archaeen.	19
Abbildung 7: Trockenfermenter	21
Abbildung 8: Linde-Laran-Biogasreaktor	22
Abbildung 9: Landwirtschaftliche Biogasreaktoren	23
Abbildung 10: BGA in einem Dezentralisierungskonzept	25
Abbildung 11: Menge des in Behandlungsanlagen eingesetzten Bioabfalls in Deutschland. .	28
Abbildung 12: Abbauwege von Polymeren in der Umwelt	29
Abbildung 13: Challenger Mechanismus der Konversion von Arsenat zu TMA	32
Abbildung 14: Geografische Standorte der untersuchten Anlagen	38
Abbildung 15: Trockenfermenter	41
Abbildung 16: Trockenfermenter im Labormaßstab	41
Abbildung 17: Konstruktionszeichnung des Trockenfermenters im Modellmaßstab	42
Abbildung 18: Konstruktionszeichnung der Perkolierungsvorrichtung	43
Abbildung 19: Satellitenreaktoren und Versuchsdesign	46
Abbildung 20: Entnahmevorrichtung	47
Abbildung 21: IR-Absorptionsspektren häufiger Polymere	52
Abbildung 22: Substratzuführung während der Flexibilisierung	53
Abbildung 23: Schematische Darstellung der ITS-Region	64
Abbildung 24: Apparatur zur Analyse volatiler As-Verbindungen	67
Abbildung 25: Absorptionsspektren der DNA-Extrakte	71
Abbildung 26: PCR mit und ohne Zugabe von BSA	73
Abbildung 27: Hauptkoordinatenanalyse der ARISA-Fragmente aus 15 Anlagen.	74
Abbildung 28: NGS der Gesamtpopulation aus verschiedenen Anlagen	76
Abbildung 29: Biogasproduktion, CH ₄ - und H ₂ -Gehalt	77
Abbildung 30: Prozessparameter während der Anlaufphase	80
Abbildung 31: Flüchtige Fettsäuren	81
Abbildung 32: Hauptkoordinatenanalyse	82

Abbildung 33: Relative Abundanz der ITS-Fragmente der methanogenen Archaeen.....	87
Abbildung 34: Relative Abundanz der 16S-rRNA-Gensequenzen.....	88
Abbildung 35: Relative Abundanz der Archaeen-16S-rRNA-Gensequenzen	90
Abbildung 36: Quantifizierung der mcrA-Genkopien	92
Abbildung 37: Gasparameter der Trockenfermentation.....	93
Abbildung 38: Relative Abundanz der ITS-Fragmente bei der Trockenfermentation.....	95
Abbildung 39: Raumbelastung, Gasertrag und CH ₄ -Anteil bei der Flexibilisierung.....	98
Abbildung 40: H ₂ -Konzentration während der Flexibilisierung	100
Abbildung 41: Hauptkomponentenanalyse	104
Abbildung 42: Dynamik der mikrobiellen Population während der Substratflexibilisierung	105
Abbildung 43: Dynamik der Archaeen-Population während der Substratflexibilisierung	106
Abbildung 44: Beispiele unterschiedlicher MPP	112
Abbildung 45: Größenfraktionen der MPP in Düngern aus der Bioabfallverwertung	113
Abbildung 46: Metalloid-Konzentrationen in den technischen Anlagen.....	117
Abbildung 47: Metall(oid)-Konzentrationen in den Flüssigphasen technischer Anlagen	118
Abbildung 48: Metall(oid)-Konzentrationen in den Gasphasen technischer Anlagen	119
Abbildung 49: Gasproduktion und CH ₄ -Gehalt der Satellitenreaktoren.....	122
Abbildung 50: Relative Abundanz der ARISA-Fragmente in den Satellitenreaktoren	124
Abbildung 51: As-Spezies in den Flüssigphasen der Satellitenreaktoren.....	126
Abbildung 52: As-Spezies in der Gasphase der Biogassatelliten	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beteiligte Schritte an der Oxidation komplexer Verbindungen	9
Tabelle 2: Wichtige Enzyme der Hydrolyse und deren Funktion	10
Tabelle 3: Prüfwerte für Arsen	31
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Geräte	34
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien	36
Tabelle 6: Verwendete Software	37
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide	37
Tabelle 8: Anlagen, Substrate und Entnahmestellen	39
Tabelle 9: Substrat und Perkolat bei der Trockenfermentation	44
Tabelle 10: Probenbezeichnung der Mikroplastikuntersuchung	50
Tabelle 11: Substratzusammensetzung bei der Flexibilisierung	54
Tabelle 12: GC-Einstellungen	55
Tabelle 13: GC-Parameter bei der CH ₄ -Bestimmung	56
Tabelle 14: Physiko-chemische Parameter	56
Tabelle 15: Kits zur DNA-Extraktion	57
Tabelle 16: Verwendete Lösungen zur DNA-Extraktion	59
Tabelle 17: qPCR-Ansätze zur Quantifizierung der mcrA-Gensequenzen	62
Tabelle 18: qPCR-Ansätze zur Quantifizierung der 16S-rRNA-Gensequenzen	62
Tabelle 19: Temperaturzyklen bei der Genquantifizierung	63
Tabelle 20: Absorptionsverhältnisse verschiedener DNA-Extrakte	70
Tabelle 21: Nachgeschaltete Säulenaufreinigung	72
Tabelle 22: Paarweiser statistischer Vergleich der Zeitphasen	83
Tabelle 23: Paarweiser statistischer Vergleich der Reaktorkompartimente	84
Tabelle 24: Seriations-Analyse der ARISA-Muster	84
Tabelle 25: Paarweiser statistischer Vergleich der Fermentationsperioden	94
Tabelle 26: Rückgang der CH ₄ -Konzentration, drei Tage nach erhöhter Substratgabe	96
Tabelle 27: pH-Wert und VFAs bei der Flexibilisierung	99
Tabelle 28: MPP > 1 mm in Gärresten landwirtschaftlicher BGAs	109
Tabelle 29: Abundanz der Mikroplastikpartikel	111
Tabelle 30: Essigsäurekonzentrationen in den Satellitenreaktoren	123

1. Einleitung

Mit dem Unterzeichnen des Übereinkommens von Paris haben sich sämtliche Staaten der Welt (Stand November 2017) dazu verpflichtet, den Anstieg der Erdtemperatur in diesem Jahrhundert auf unter 2° C zu halten ¹. Das Zwischenziel für das Jahr 2030 aus dem Klimaschutzplan 2050 gibt eine Reduktion der Treibhausgase um 55 % gegenüber den Emissionen im Jahre 1990 aus ². Hierzu wird ein massiver Ausbau der erneuerbaren Energien und eine Abwende von fossilen Energieträgern notwendig. Einen Beitrag hierzu soll Energie aus biologisch erzeugten Energieträgern darstellen. Während Windkraft und Fotovoltaik von Jahreszeiten und Wetterverhältnissen abhängen, kann Energie aus Biomasse davon unabhängig erzeugt werden. Eine Möglichkeit aus Biomasse einen Energieträger zu erzeugen, stellt die Vergärung zu Biogas dar. Biogas entsteht, wenn organische Verbindungen unter Luftabschluss (anaerob) biologisch abgebaut werden. Die Zusammensetzung des entstehenden Gases hängt stark von den Substraten ab und kann aus bis zu zwei Dritteln Methan (CH₄) sowie zu einem Drittel aus Kohlenstoffdioxid (CO₂) bestehen und enthält außerdem Spuren anderer Gase wie Wasserstoff (H₂) oder Schwefelwasserstoff (H₂S) ^{3,4}. Der Methanbildungsprozess lässt sich in mehrere Stufen gliedern, an denen eine Vielzahl unterschiedliche Mikroorganismen beteiligt sind. In der richtigen Mischkultur aus Bakterien und methanogenen Archaeen können nahezu alle organischen Verbindungen zu CH₄ und CO₂ umgewandelt werden ⁵.

Für das entstehende Gas bestehen vielfältige Nutzungsmöglichkeiten. Häufig wird das CH₄/CO₂-Gemisch direkt in Blockheizkraftwerken (BHKWs) verbrannt und daraus Energie in Form von Wärme und Strom gewonnen. Eine weitere Verfahrensweise stellt die Entfernung von CO₂ aus dem Gemisch dar. Das gewonnene Biomethan kann anschließend in das Erdgasnetz eingespeist oder gespeichert und bei Bedarf verbrannt werden. Durch Biogas/Biomethan kann ein Ausgleich der Fluktuation anderer erneuerbarer Energien erzielt oder herkömmliches Erdgas substituiert werden.

In Deutschland entfielen im Jahr 2016 4.497 Megawatt (MW) installierte elektrische Leistung auf Biogasanlagen (BGA), wodurch Bruttostrom von über 30.000 Gigawattstunden (GWh) sowie 17.000 GWh Wärme bereitgestellt wurden ⁶. Die Einsparung an CO₂ betrug hierbei 21 Millionen Tonnen (t). Zudem werden beträchtliche Mengen an artifiziellm Dünger durch die Reststoffe aus dem Biogasprozess ersetzt. Im Jahre 2015 waren deutschlandweit 46.000 Menschen im Biogassektor beschäftigt ⁶⁻⁸.

Allgemein findet in Europa ein Zubau von BGAs statt. Es zeigen sich jedoch regionale Unterschiede. In zentral- und osteuropäischen Staaten wie Polen, Ungarn und der Slowakei wächst die Zahl der Anlagen momentan sehr schnell. Auch in Schweden, Großbritannien und Dänemark nimmt die Anlagenzahl zu, während in Deutschland und Österreich eine Stagnation eingetreten ist ⁹.

Um der Stagnation entgegenzuwirken, sind neue Konzepte und Innovationen notwendig, die die Erzeugung von Biogas als erneuerbaren und energieneutralen Energieträger noch nachhaltiger und ergiebiger gestalten können. Vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) geförderte Ansatzpunkte sind die Anlagenflexibilisierung, Systemintegration, Power-to-Gas und die Optimierung der biologischen Prozesse ¹⁰.

Als Beitrag hierzu wurden in der vorliegenden Dissertation nachfolgende Hypothesen bearbeitet und daraus Möglichkeiten zur Optimierung des Biogasprozesses auf Ebenen der Mikrobiologie, der Verfahrenstechnik sowie der Prozessanalyse abgeleitet.

Zielsetzung der Arbeit

Dynamik der Anlaufphase einer Biogasanlage im technischen Maßstab: Die Phase nach dem Inokulieren (Animpfen) wird als hochdynamischer Zeitraum eingeschätzt, der über einen Etablierungsprozess zu einer stabilen mikrobiellen Gemeinschaft in der BGA führt. Die entstehende mikrobielle Gemeinschaft beeinflusst maßgeblich die Effizienz und Stabilität des Reaktors. Kenntnisse über das komplexe Zusammenspiel der Mikroorganismen und der resultierenden Leistungsparameter des Reaktors werden als wichtige Grundlagen für weitere Forschungsarbeiten zur Prozessoptimierung sowie der Effizienzsteigerung angesehen. Ziel der Arbeit war es, die Vorgänge während der Etablierungsphase sowohl populationsdynamisch, als auch anhand der Anlagendaten zu erfassen und umfassend darzustellen.

Technischer- und Labormaßstab: Experimente zum Biogasprozess werden, aufgrund der einfachen Durchführbarkeit, in der Regel auf Modellreaktoren in deutlich kleinerem Maßstab übertragen. Diese Versuche sind notwendig, da in den meisten Fällen keine Realisierbarkeit der Versuchsansätze im Produktionsmaßstab gegeben ist. Die Erwartung ist, dass Ergebnisse dieser Versuche aussagekräftig für den realen Prozess sind, was aber nur bedingt der Fall ist. Als Grund hierfür werden skalierungsbedingte Bedingungsänderungen angenommen, die dazu führen, dass sich die mikrobielle Zusammensetzung im Modellreaktor mit der Zeit von der Zusammensetzung in der Großanlage entfernt und hierbei eine Verarmung stattfindet. In der

Arbeit sollte deshalb der Entwicklungsprozess der mikrobiellen Gemeinschaft nach Übertrag auf einen Modellreaktor untersucht werden.

Vorgänge bei der Substratflexibilisierung: Der Ausbau erneuerbarer Energien hängt ab von der Entwicklung von Energiespeichern zum Ausgleich der Fluktuation erneuerbarer Energien. Einen wichtigen Beitrag hierzu können Biogasspeicher leisten. Um diesen Prozess effizient zu gestalten, kommt das Konzept der Substratflexibilisierung in Frage. Durch eine bedarfsgerechte Produktion von Biogas kann Substrat eingespart, die Standzeit von Blockheizkraftwerken (BHKWs) verlängert und die Problematik der begrenzten Gasspeicherkapazität gelöst werden. Flexibilisierte Fütterung führt zu wiederkehrender Unterbrechung des Nahrungsangebots für die Mikroorganismen und damit verbunden auch zu Knappheit der Intermediaten für nachfolgende Vergärungsstufen. Es wird erwartet, dass ein Prozess angestoßen wird, der zu einer Verschiebung des Mikrobioms und auf die Dauer zur Etablierung von Organismen führt, die sich diesen wechselnden Bedingungen anpassen, möglicherweise einhergehend mit weiterer Effizienzsteigerung. Ein Ziel der Arbeit war es, eine Langzeitflexibilisierung zu untersuchen sowie die Reaktion der mikrobiellen Entwicklung und der Raumzeitausbeute.

Mikroplastikbelastung durch organische Dünger aus Biogasanlagen und Kompostierung: Die Belastung durch Polymere, die in die Umwelt geraten, rückt immer weiter in den Fokus der Öffentlichkeit. Zunehmend wird ersichtlich, dass vor allem Kleinstpartikel (Mikroplastik) ubiquitär in der Umwelt vorkommen und bereits in die Nahrungskette eingedrungen sind. Während die Forschung hauptsächlich aquatische Systeme im Blick hat, wurden terrestrische Systeme bisher kaum untersucht. Es wird angenommen, dass organische Dünger, die aus der Vergärung oder Kompostierung von Bioabfällen stammen, eine signifikante Eintragsquelle für Mikroplastik in die Umwelt darstellen. In der Arbeit wurde dieser Sachverhalt an einigen Anlagen exemplarisch untersucht sowie die Polymere charakterisiert und quantifiziert.

Metalloidbelastung: Die Hydrierungs- und Methylierungsaktivität von Mikroorganismen ist für verschiedenen Metalloide, auch unter anaeroben Bedingungen, belegt. Häufig entstehen hoch toxische Substanzen, die abhängig von der Spezies in der flüssigen Phase bleiben oder in die Gasphase übergehen können. Es wird vermutet, dass durch Gärhilfsmittel und Substrat Metalloide in BGAs eingetragen werden und dort auf ein hochaktives Konsortium treffen. Darüber hinaus könnten die resultierenden Ausprägungen von der gebildeten Spezies abhängig sein. Ziel der Untersuchung war es, zunächst verschiedene Anlagen auf Metalloid- und im speziellen auf die As-Belastung und das Vorhandensein verschiedener As-Spezies in Gas und Fermenterschlämme zu untersuchen. Zudem sollte die Reaktion der Mikroorganismen auf

verschiedene As-Belastungen untersucht werden. Hieraus sollte die Relevanz der Auswirkungen auf die Prozessstabilität und -effizienz, Mensch und Umwelt sowie auf die Gasqualität prognostiziert werden.

2. Grundlagen

Die Entdeckung und letztendlich die Nutzbarmachung von Biogas durch den Menschen erfolgte über einen langen Zeitraum. Biogas findet erstmals Erwähnung in dem altchinesischen Buch „Feuer in den Marschen“, das vor ca. 3000 Jahren geschrieben wurde. 1776 wurden auch die Europäer auf die Bildung von CH_4 aufmerksam. Die Entdeckung wird dem italienischen Physiker Alessandro Volta zugeschrieben, der später als Erfinder der Batterie bekannt wurde und heute als Mitbegründer des elektrischen Zeitalters gilt (Abbildung 1). Er entdeckte „brennbare Luft“ in Flusssedimenten, die er auffing und entzündete ¹¹. Volta konstruierte aus seiner Entdeckung den ersten Vorläufer des Gasfeuerzeugs, die „Volta-Pistole“, in der CH_4 durch einen Funken entzündet wird und sich eine stetige Verbrennungsflamme bildet ¹².



Abbildung 1: A. Volta beim Sammeln von Methan (1777) (entnommen aus Wolfe ¹³)

Der Physiker Alessandro Volta entdeckte, dass durch Rühren in Sumpfmarschen Gasblasen mit einem entzündbaren Gas aufstiegen, die er mit einem Gefäß auffing. Die Zeichnung aus Voltas Briefen: „Brennbare Luft aus den Marschen“ zeigt ihn beim Methansammeln. In Versuchen fand er heraus, dass das Gasgemisch entzündbar ist (rechts im Bild).

Sir Humphrey Davy und John Dalton entdeckten unabhängig voneinander zwischen 1804 und 1808 die chemische Zusammensetzung von brennbarem Gas ¹⁴. Der französische Chemiker und Biologe Antoine Bechamp fand schließlich heraus, dass CH₄ auf biologischem Wege durch Mikroorganismen gebildet wird und entdeckte 1868 einen Mikroorganismus, der CH₄ aus Ethanol bildete ¹⁵.

Ulysse Gayon fermentierte 1883 erstmals gezielt CH₄ ^{15,16}. Die erste dokumentierte energetische Nutzung von Biogas erfolgte 1897, als eine anaerobe Vergärungsanlage in einer indischen Leprakolonie nahe Bombay errichtet wurde. Das entstehende Gas wurde zur Erzeugung von Licht verbrannt. Zudem wurde der hohe Nährstoffgehalt der Gärreste erkannt und diese als Dünger verwendet ^{15,17}. Ebenfalls 1897 entwickelte der Engländer Donald Cameron ein System, das die gesamten Abwässer der Stadt Exeter in Großbritannien klärte. Das im Prozess entstandene Biogas wurde für die Straßenbeleuchtung und zur Generierung von Wärme genutzt ¹⁵.

Zwischenzeitlich hat sich Biogas zu einem weltweit genutzten Energieträger entwickelt. Laut Schätzungen werden jährlich 42 Gm³ Biogas zur energetischen Weiterverwertung erzeugt ¹⁸. Der weltweit größte Produzent von Biogas ist China, da durch ein staatliches Förderprogramm die Anzahl an BGAs in den letzten Jahren deutlich gestiegen ist. Im Jahre 2013 waren 43 Mio. chinesische Haushalte an eine Biogasversorgung angeschlossen ⁹.

Die Anwendungsgebiete von Biogas lassen sich in die Bereiche Verstromung, Wärmeauskopplung und Einspeisung unterteilen.

Neben einigen kaum realisierter Ansätze zur *Biogasverstromung* wie Mikrogasturbinen, Brennstoffzellen und Sterlingmotoren ist die mit Abstand am häufigsten angewandte Methode, um aus Biogas Strom zu gewinnen, die Verbrennung in Blockheizkraftwerken (BHKW) ⁷. Hierbei werden BHKWs verwendet, die neben Verbrennungsmotor und Generator zur Stromerzeugung mit Nebenaggregaten zur Gemischregelung, Abwärmekopplung, Reinigung und Stromeinspeisung in das elektrische Netz bestückt sind ^{3,4}. Addiert man elektrischen und thermischen Wirkungsgrad, können von BHKWs Wirkungsgrade zwischen 80 und 90 % erreicht werden. Für Ottomotoren kann angenommen werden, dass der thermische und der elektrische Wirkungsgrad jeweils etwa 50 % des Gesamtwirkungsgrades beträgt. Wirkungsgrade von mit Ottomotoren betriebenen BHKWs liegen zwischen 34 und 40 %, können jedoch in der Realität aufgrund schwankender Qualität des Biogases geringer ausfallen ⁷. Die größte *Wärmemenge* bei der Gasverstromung fällt als Abwärme des Verbrennungsmotors

an. Diese Wärme kann durch ein Kühlwassersystem aufgefangen, durch Plattenwärmeüberträger ausgekoppelt und über einen Verteiler an einzelne Heizkreisläufe im Prozess weitergeleitet werden. Die entstehende Wärme reicht hierbei aus, um den Wärmebedarf der Anlage zu decken. Durch externe Nutzung können zudem beispielsweise Betriebs-, Wohn- oder Büroräume und je nach Umfeld der Anlage auch Schulen und Schwimmbäder beheizt werden. In warmen Monaten muss hingegen unter Umständen durch einen Notkühler Wärme abgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Nutzung von Biogas, die in letzter Zeit stark an Bedeutung gewinnt, ist die *Einspeisung in das Erdgasnetz*. Ein Ziel der Bundesregierung, die Biomethan als eine Schlüsseltechnologie der Energiewende fördert, ist es, bis 2020 jährlich sechs Milliarden Kubikmeter Erdgas durch Biomethan zu substituieren ¹⁹. Die erste Anlage zur Methanaufbereitung und Einspeisung wurde 2006 errichtet. Seither hat die Anlagenzahl stark zugenommen. Anfängliche Schwierigkeiten mit der Aufbereitung auf Erdgasqualität sind heute größtenteils überwunden. Aufbereitungstechnologien wie Druckwechseladsorption, Druckwasserwäsche sowie chemische und physikalische Wäschen haben sich am Markt etabliert. Aktuell sind auch erste Anlagen in Betrieb, die Biomethan mit Membrantrennverfahren gewinnen ⁷. Zudem gibt es Möglichkeiten, Biogas zu einspeisungsfähigem CH₄ über biologische Methanisierung mittels hydrogenotropher Archaeen aufzubereiten ²⁰.

2.1 Der anaerobe Abbauprozess

Der Biogasprozess ist ein komplexer Reduktionsprozess, bei dem hochmolekulare Verbindungen im weitgehend O₂-freien (anaeroben) Milieu durch das Zusammenspiel verschiedener Mikroorganismengruppen zu hauptsächlich CH₄ und CO₂ abgebaut werden. Eine vereinfachte Übersicht über die Abbauvorgänge gibt Abbildung 2.

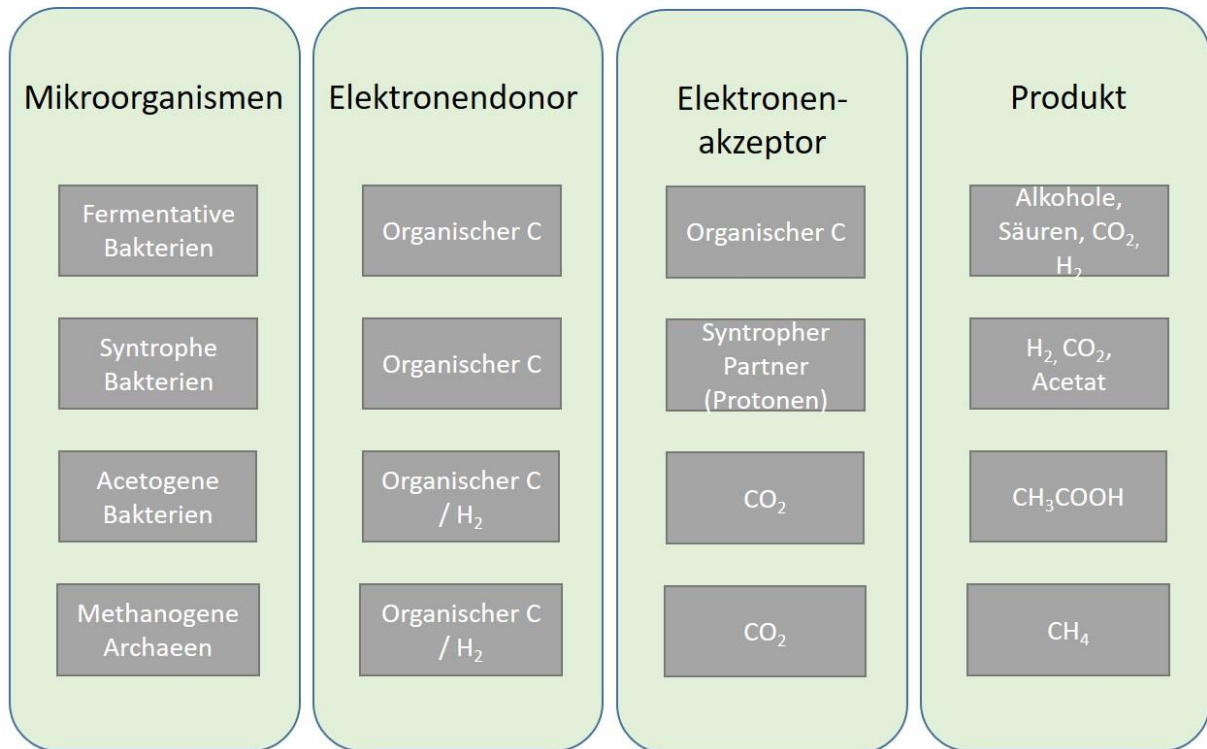


Abbildung 2: Zusammenspiel der Mikroorganismen beim Abbau organischen Materials (adaptiert aus Zieminski ²¹)

Eine Übersicht über den Abbauprozess in Form eines dreistufigen Modells ist in Abbildung 3 dargestellt.

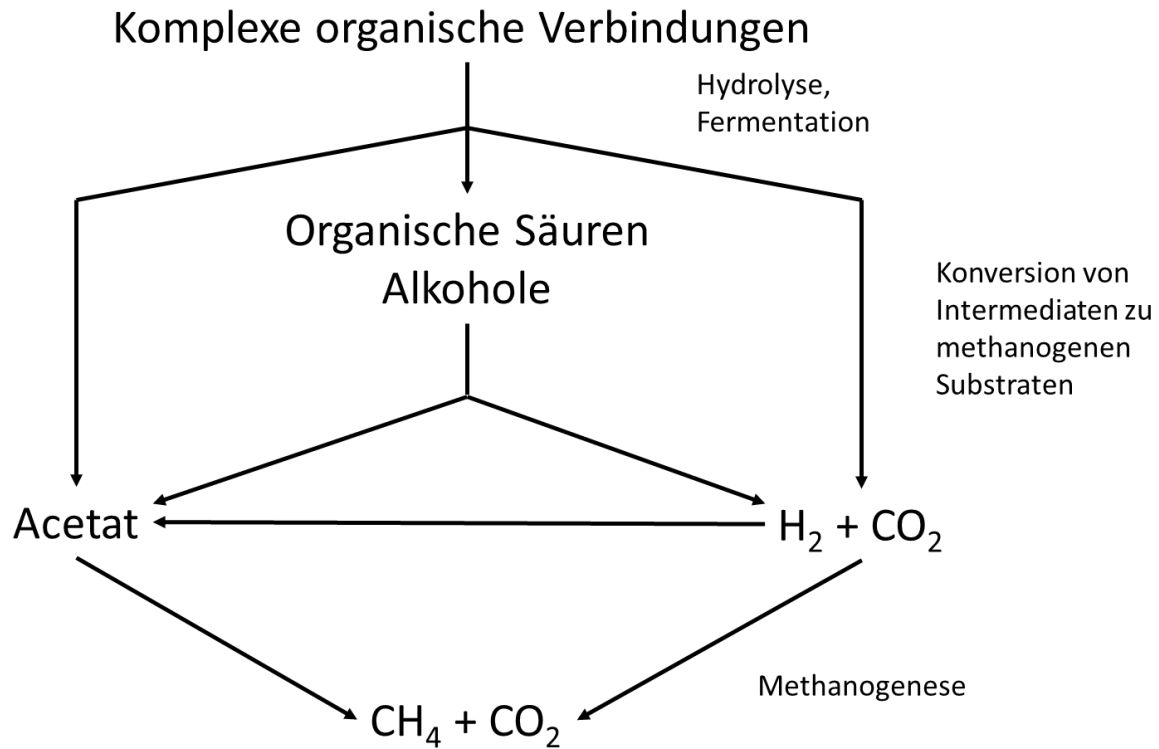


Abbildung 3: Dreistufenmodell des anaeroben Abbaus (adaptiert aus Drake ²²)

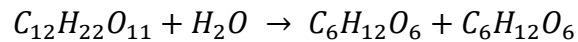
Das Modell zeigt, wie komplexe organische Verbindungen unter anaeroben Bedingungen mit CO₂ als primären terminalem Elektronenakzeptor zu Substraten für die Methanogenese abgebaut werden.

Reaktionen der Hydrolyse, Fermentation, Acetogenese und Methanogenese sind in Tabelle 1 aufgezeigt. Während der Hydrolyse werden zunächst hochmolekulare, meist unlösliche organische Biomoleküle wie Cellulose, Proteine und Fette zu löslichen Zuckern, Aminosäuren, Glycerin und Fettsäuren abgebaut. Diese Reaktionen werden durch extrazelluläre Enzymgruppen (Cellulasen, Amylasen, Proteasen und Lipasen) katalysiert, die von anaeroben Clostridien und Bifidobakterien sowie fakultativ anaeroben Enterobakterien und Streptokokken sekretiert werden ^{5,21,23,24}. Die gebildeten Substanzen dienen unmittelbar zum Aufbau von mikrobieller Biomasse und Enzymen und im weiteren Verlauf als Nährstoffe für andere Mikroorganismen. Zudem wird während der Hydrolyse Restsauerstoff verbraucht, wodurch sauerstofffreie Mikrohabitate für strikt anaerobe Organismen geschaffen werden ²⁵.

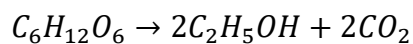
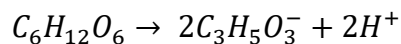
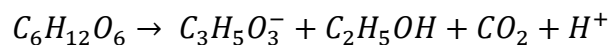
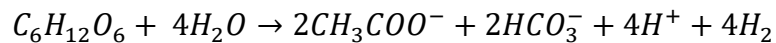
Tabelle 1: Beteiligte Schritte an der Oxidation komplexer Verbindungen ^{5, 24,26}

Es sind beispielhaft einige Reaktionen der jeweiligen Abbaustufen im Biogasprozess aufgezeigt. Während der Hydrolyse werden komplexe Polymere zu Monomeren abgebaut. Gleichung (A) zeigt die hydrolytische Spaltung von Saccharose unter Bildung von Fructose und Glucose. Durch Fermentation (B) werden die Monomere von fermentativen Organismen zu Fettsäuren, Alkoholen sowie H₂ und CO₂ katabolisiert. Dargestellt ist die Fermentation von Glucose zu Acetat, Wasserstoff und CO₂, die Entstehung von Ethanol durch die heterofermentative Milchsäuregärung sowie in Folge die homofermentative Milchsäuregärung und die alkoholische Gärung unter Entstehung von Ethanol. Reaktionen, die aus energetischen Gründen nur durch Syntrophie ablaufen können, sind auf der Seite 11 erläutert. Die Gleichungen unter (C) zeigen die acetogene Bildung von Acetat. Bei zuerst gezeigter Reaktion dient CO₂ als Elektronenakzeptor und H₂ als e⁻-Donor. Die zweite Reaktion zeigt die Bildung von drei Molekülen Acetat aus Glucose. Unter D dargestellte Reaktionen zeigen Beispiele für die Methanogenese aus Essigsäure, H₂ und CO₂ sowie aus Ethanol.

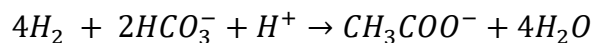
(A) Hydrolyse



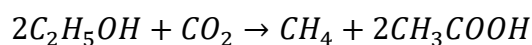
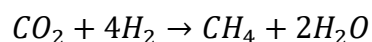
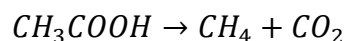
(B) Fermentation



(C) Acetogenese



(D) Methanogenese



Da durch die Hydrolyse die Ausgangsstoffe im weiteren Abbau- und Methanbildungsprozess generiert werden, gilt sie als limitierender Schritt der Biogasproduktion. Je mehr

hochmolekulare Substratbestandteile zerlegt werden können, desto effizienter ist letztendlich die Gasausbeute ²⁵. Die Effizienz der Hydrolyse wird neben den Organismen, der Enzymdichte sowie dem pH-Wert maßgeblich durch die Zusammensetzung des Substrates beeinflusst ²¹. Manche Organismen sekretieren eine Vielzahl an Enzymen, die es ermöglichen, verschiedene Gruppen organischer Substanzen abzubauen. Andere Organismen sind spezialisiert auf den Abbau bestimmter Stoffgruppen und sekretieren spezielle Enzyme, beispielsweise zum Abbau von Zuckern (saccharolytische Organismen) oder Proteinen (proteolytische Organismen) ²⁷. Tabelle 2 zeigt wichtige Enzyme der Hydrolyse, deren Substrate und die entstehenden Abbauprodukte.

Tabelle 2: Wichtige Enzyme der Hydrolyse und deren Funktion ²⁷

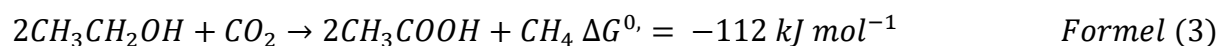
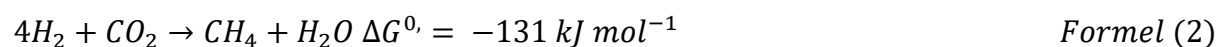
Enzyme	Substrate	Produkte
Proteasen	Proteine	Aminosäuren
Cellulasen	Zellulose	Cellobiose und Glucose
Hemicellulasen	Hemicellulose	Zucker (u.a. Glucose, Xylose, Manose und Arabinose)
Amylasen	Stärke	Glucose
Lipasen	Fette	Fettsäuren und Glycerol
Pektinasen	Pektin	Zucker (u.a. Galactose, Arabinose und Uronsäuren)

Manche Produkte wie beispielsweise Acetat, können bereits während der Hydrolyse entstehen, und von methanogenen Archaeen direkt zu CH₄ umgesetzt werden. Die meisten Moleküle müssen in weiteren Schritten abgebaut werden ²³. Das entstehende Hydrolysegas besteht größtenteils aus energetisch unbedeutendem CO₂ und Schwefelwasserstoff (H₂S) und ist daher für die Nutzung ungeeignet.

Unmittelbar auf die Hydrolyse folgt die Fermentation. In dieser Phase werden wasserlösliche Verbindungen, unter anderem Verbindungen, die während der Hydrolyse entstehen, von anaeroben Organismen abgebaut. Einige dieser Organismen sind vorher bereits an der Hydrolyse beteiligt und weitestgehend den Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* und *Flavobakterium* zugehörig. Als Endprodukte entstehen H₂, CO₂, Alkohole (Methanol, Ethanol), kurzkettige organische Säuren und Aldehyde. Beim Abbau von Aminosäuren entsteht zudem Ammoniak ^{5,21}. Fakultativ anaerobe Organismen sorgen wie bei

der Hydrolyse dafür, dass eingetragener Sauerstoff verbraucht wird. Die Häufigkeit und Verhältnisse der entstehenden Verbindungen hängen von den Prozessbedingungen, den Substraten sowie von den vorhandenen Organismen ab ^{27,28}. Die Zusammensetzung der fermentierten Produkte kann daher zwischen unterschiedlichen Anlagen variieren.

Syntrophien ermöglichen es, thermodynamisch ungünstige Reaktionen durch die Kopplung mit einer zweiten, energetisch günstigen Reaktion stattfinden zu lassen. In einer ersten Reaktion gebildeter H₂ wird nach Interspezies-H₂-Transfer von einer weiteren Organismengruppe umgesetzt. Hierdurch wird die Konzentration an H₂ auf einem sehr geringen Niveau gehalten. Es sind eine Vielzahl von Syntrophien bekannt ²². Ein Beispiel stellt der Abbau von Ethanol zu Essigsäure und Methan dar. Der syntrophe Organismus ist für eine Reaktion verantwortlich, deren freie Energie unter Standardbedingungen positiv ist (Formel 1). Der hierbei gebildete H₂ dient in Folge einem Methanogenen als Elektronendonator in einer exergonen Reaktion (Formel 2). Werden beide Reaktionen summiert, ist die Gesamtreaktion exergon und liefert beiden Organismen Energie (Formel 3) ^{5,22}.



Während der Acetogenese werden Verbindungen durch anaerobe Oxidation zu Substraten für die Methanogenese. Acetogene Bakterien, die als organisches Endprodukt Acetat bilden, führen diesen Schritt durch. Man unterscheidet Organismen, die durch Reduktion von CO₂ mittels Wasserstoff Acetat bilden (Wasserstoff kann hierbei als molekularer Wasserstoff bezogen oder aus organischen Verbindungen abgespalten werden) und Organismen, die Propionat und Butyrat durch anaerobe Oxidation zu Acetat und H₂ abbauen ²⁷.

Bereits ein geringer H₂-Partialdruck hat zur Folge, dass die Acetogenese zum Erliegen kommt. Während der anaeroben Oxidation werden Protonen als finale Elektronenakzeptoren verwendet. Hierbei wird H₂ frei. Die Bildung von H₂ kann aus thermodynamischen Gründen, nur stattfinden, wenn sich die H₂-Konzentration auf einem niedrigen Level befindet. Wird der gebildete H₂ nicht kontinuierlich verbraucht, kommt die Acetogenese zum Erliegen, da die beteiligten Organismen verhungern ^{27,29}. Durch die Bildung von CH₄ im nächsten Schritt des Prozesses wird der gebildete H₂ kontinuierlich verbraucht. Die methanbildenden Archaeen wachsen wiederum, im Gegensatz zu den acetogenen Bakterien, besser bei höheren H₂-

Partialdrücken. In einem funktionierenden Prozess stellt sich ein sensibles Gleichgewicht ein^{27,30}. Zudem wurden profunde Auswirkungen der Konzentration von H_2 auch auf die Genexpression und die Energiekonservierung methanogener Archaeen beschrieben³¹.

In der letzten Stufe des Abbauprozesses, der Methanogenese, wird Biogas gebildet. Für diesen Prozess sind verschiedene methanogene Archaeen verantwortlich.

Die Domäne der Archaeen teilt sich in zwei Klasse, Euryarchaeota (vom griechischen euryos, Vielfalt) und Crenarchaeota. Sämtliche methanogene Archaeen werden taxonomisch zur Klasse der Euryarchaeota gezählt, und sind dort fünf Ordnungen vertreten: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* und *Methanosarcinales*³². Die methanogenen Archaeen sind ausnahmslos obligat anaerob und von Stoffwechselprodukten anderer Organismen abhängig. Es konnten mindestens elf Substrate nachgewiesen werden, die von Reinkulturen methanogener Archaeen zu CH_4 umgewandelt werden können. Häufig vorkommende Verbindungen wie Glucose, organische Säuren oder Fettsäuren (außer Acetat und Pyruvat) gehören jedoch nicht dazu³³.

Als Substrate für die *Methanogenese* im Biogasprozess dienen letztendlich drei Klassen: Methylsubstrate, Substrate des CO-Typs (hydrogenotrophe) und acetoklastische Substrate. In Abbildung 4 findet sich einer Übersicht über die drei bekannten Hauptwege der Methanogenese aus den verschieden Substrattypen.

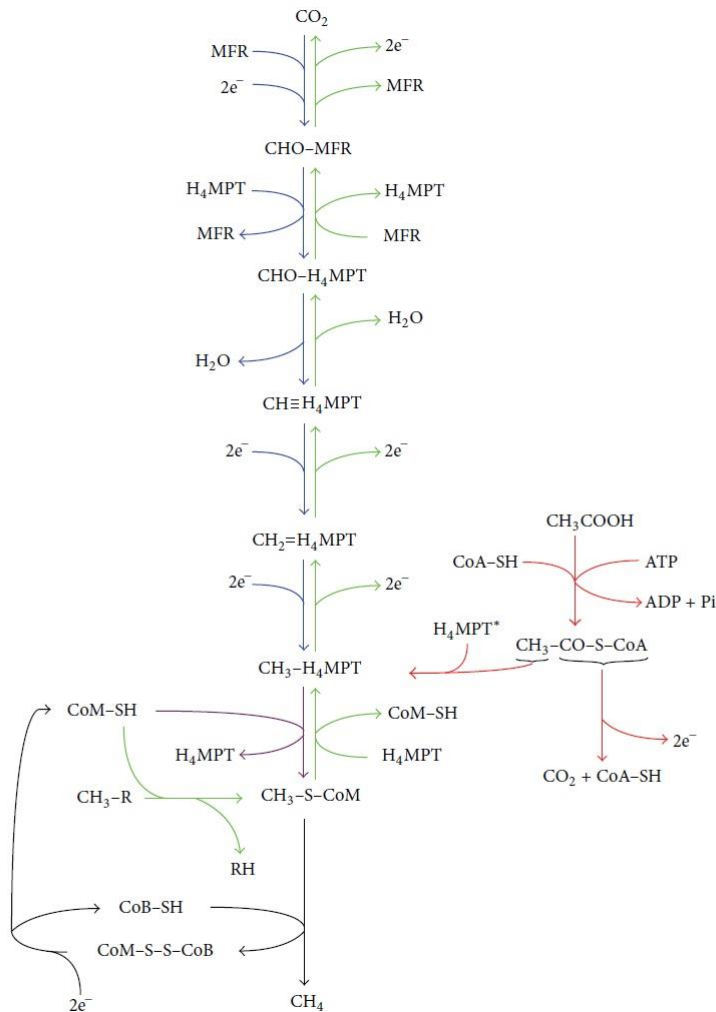
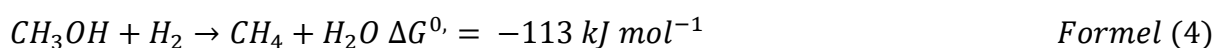


Abbildung 4: Stoffwechselwege der Methanogenese. (entnommen aus Browne ³⁴)

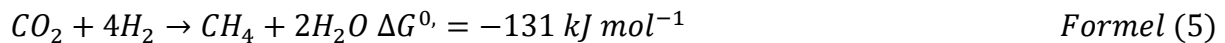
Überblick über die drei bekannten Hauptwege der Methanogenese. Die farblich kodierte Darstellung zeigt Schritte, die für gewöhnlich bei allen Wegen vorkommen (schwarz), Schritte die nur im methylotrophen Weg vorkommen (grün), Schritte die einzig im hydrogenotrophen (CO_2 -reduzierenden) Weg vorkommen (blau), Schritte die einzig im acetoklastischen Weg stattfinden (rot) und Schritte die sowohl in der hydrogenotrophen wie auch in der acetoklastischen Methanogenese stattfinden (violett). MFR: Methanofuran; H_4MPT : Tetrahydromethanopterin; CoM-SH: Coenzym M; CoA-SH: Coenzym A; CoM-S-S-CoB: Heterodisulfid von Coenzym M und Coenzym B; R: Ligand an der methylierten Verbindung, der als Substrat für die methylotrophe Methanogenese dient.

Zur ersten Klasse gehören methylierte Substanzen wie beispielsweise Methanol oder Methylamin. Formel 4 zeigt die Reaktion zu CH_4 aus Methanol unter Anwesenheit von H_2 .

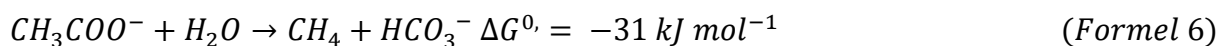


Zur zweiten Substratgruppe gehört hauptsächlich CO_2 , das mit H_2 als Elektronendonator über Zwischenprodukte zu CH_4 reduziert wird, jedoch auch Formiat und Kohlenmonoxid (CO) ⁵. Die vereinfachte Reaktionsgleichung ist in (Formel 5) dargestellt. Diese Form der

Methanbildung ist hydrogenotrophen Archaeen aus den Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobeales*, *Methanocellales* und *Methanopyrales* zuzuschreiben. Aus der Ordnung *Methanosarcinales* sind zudem einige fakultativ hydrogenotrophe Organismen bekannt. Diese sind jedoch primär methylotroph oder acetoklastisch ³⁵.



Die dritte Klasse methanogener Substrate stellen Acetate dar. Diese werden bei der acetoklastischen Spaltung zu CO_2 und CH_4 gespalten (Formel 6). Die acetoklastischen Methanogenen sind bezüglich ihrer Vielfalt eher unbedeutend, spielen aber aus ökologischer Sicht eine wichtige Rolle. Wie Untersuchungen in Klärschlamm gezeigt haben, stammen ungefähr zwei Drittel des gebildeten Methans aus Acetat, während ein Drittel aus $CO_2 + H_2$ entstammt ⁵. Die acetoklastische Methanisierung wird ausschließlich von Archaeen aus der Ordnung *Methanosarcinales* durch die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) durchgeführt, von dem aus eine Methylgruppe in den methanogenen Stoffwechsel transferiert wird ³⁶.



Das große Konsortium an Bakterien und Archaeen, die während des Abbaus von Biomasse und dem Methanbildungsprozess zusammenspielen, verdeutlicht, dass sowohl ein stabiler Prozess als auch eine hohe Biogasausbeute in technischen Anwendungen entscheidend vom Verständnis der mikrobiellen Abläufe abhängen.

Obwohl die groben Zusammenhänge und Abläufe im biologischen Abbauprozess bekannt sind, ist über das genaue Zusammenspiel der beteiligten Organismen und Stoffwechselkreisläufe noch vieles ungeklärt ²⁴. Dies kann zu erheblichen Problemen und Leistungsminderungen von Biogasreaktoren führen. Eine effiziente Möglichkeit zur Erforschung dieser Abläufe bieten molekularbiologische Methoden.

2.2 Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften

Klassischen Kultivierungsmethoden basieren auf Isolierung und Vereinzelung der Organismen zu Reinkulturen auf speziellen Nährmedien, gefolgt von der Identifikation, beispielsweise durch physiologische und morphologische Merkmale. Man geht jedoch davon aus, dass die meisten der Bakterien aus Umweltproben (99,5 bis 99,9 %), die im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden können, unter Laborbedingungen nicht oder nur sehr schwer kultivierbar sind ³⁷. Infolge der Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) begann die Entwicklung von Methoden,

die unabhängig von der Kultivierung der Mikroorganismen sind. Diese untersuchen beispielweise Gene, die für die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA), oder spezifische Proteine kodieren ³. So können spezifische Sequenzen identifiziert werden, die Differenzierungen auf niedrigster phylogenetischer Ebene ermöglichen ³⁸.

Für unterschiedliche Anwendungen und Fragestellungen bieten sich eine Reihe von molekularbiologischen Analysenmethoden an. Die für die vorliegende Arbeit wichtigen Methoden sind im Folgenden beschrieben.

2.2.1 DNA-Extraktion aus Umweltproben

Eine entscheidende Rolle für die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit molekularbiologischer Analysen spielt die Extraktion der DNA und die hierbei erzielte Qualität und Reinheit. Vor allem bei Proben mit komplexer Matrix werden aufwendige Aufreinigungsschritte notwendig, um ausreichende Qualität zu gewährleisten. Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten Verfahren zur DNA-Extraktion. Bei indirekten Verfahren werden die Zellen durch Dispersion der Matrix abgetrennt und die isolierten Zellen außerhalb der Matrix lysiert. Direkte Verfahren basieren auf der Lyse der Zellen in der Matrix. In weiteren Schritten wird die DNA extrahiert und gereinigt. Da indirekte Verfahren den Nachteil haben, dass Zellen nur unvollständig aus der dichten Matrix gelöst werden, und zudem an verschiedenen Fraktionen absorbieren können, eignen sich direkte Verfahren besser für molekularbiologische Analysen ³⁹.

Eine wichtige Rolle spielt die Abtrennung von Enzyminhibitoren wie Huminstoffen, da diese in der Folge die PCR hemmen ^{40,41}. Huminstoffe können nach ihrer Löslichkeit in drei Kategorien eingeteilt werden: Huminsäuren, die nur unter alkalischen Bedingungen löslich sind, Fulvinsäuren, die in jedem Milieu löslich sind, sowie unlösliche Humine ⁴².

In der Literatur finden sich viele Methoden zur DNA-Extraktion, die jedoch weitgehend demselben Prinzip folgen: Zunächst werden die Zellen aufgeschlossen und das Zellinnere in Lösung gebracht. Um den Abbau der DNA durch Enzyme aus Matrix und Zellinnerem zu unterbinden werden verschiedene Chemikalien zugesetzt, die entweder an die Enzyme selbst oder an Co-Faktoren der Enzyme binden. Zudem wird meist bei niedrigen Temperaturen gearbeitet um die Enzymkinetik möglichst langsam zu halten. In weiteren Schritten werden Proteine denaturiert und mit anderen Zellbestandteilen und Verunreinigungen abgetrennt. Hierzu kommen meist verschiedene Chemikalien, je nach Verfahren auch mit Säulen kombiniert, zum Einsatz. Im letzten Schritt wird die DNA von Salzen befreit, die vorherigen

Ausfällungsschritten zugesetzt werden. Zur Bestimmung der Konzentration der genomischen DNA (gDNA) werden meist spektrometrische Messungen angeschlossen.

2.2.2 DNA-Fingerprinting

Mit *Fingerprinting Techniken* wird die Diversität eines mikrobiellen Konsortiums zu einem bestimmten Zeitpunkt dargestellt. Diese Methoden werden häufig in der Umweltbiologie eingesetzt, um die genetische Diversität von Lebensgemeinschaften an verschiedenen Standorten zu vergleichen ^{39,43,44}. Durch die Aufnahme mehrerer Zeitpunkte werden Fingerprinting Techniken zu einem interessanten Werkzeug der Prozessanalyse. Beispielsweise können gezielt Änderungen der Diversität festgestellt und mit Abweichungen in der Produktbildungsrate korreliert werden. Letztendlich können Zusammenhänge mit Prozessparametern gefunden und so wichtige Punkte im Prozess identifiziert werden.

Häufig verwendete Fingerprinting Techniken sind die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE), Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE), Terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (T-RFLP) sowie die Automatisierte Ribosomale Intergenische Spacer Analyse (ARISA) ³⁹. Anwendungsbeispiel zur Diversitätsanalyse in Biogasreaktoren finden sich in der Literatur. Es wurde die FISH verwendet, um mit gruppen- bzw. ordnungsspezifischen Sonden die Archaeendiversität in Klärschlamm- und Güllevergärern zu untersuchen ⁴⁵. Es werden die Auswirkungen auf die Bakterien- und Archaeenpopulation bei Erhöhung der Betriebstemperatur von 55° C auf 75° C verfolgt ⁴⁶, sowie die ARISA zur Beobachtung der methanogenen Archaeen im Biogasreaktor vorgestellt ⁴⁷. Eine weitere Studie verfolgte die Entwicklung der Gemeinschaften in Batchreaktoren, die mit unterschiedlichen Starterkulturen beimpft wurden ⁴⁸. Die ARISA wurde durch die Untersuchung von Bakterien- und Pilzgemeinschaften aus Böden vierer unterschiedlicher geografischer Regionen evaluiert. Es zeigte sich, dass die Größenverteilung sowie Unterschiede zwischen den detektierten Fragmenten dargestellt werden konnten. Anhand charakteristischer Peaks konnten die Bodenproben eindeutig der jeweiligen Region zugeordnet werden. Die Ergebnisse erwiesen sich zudem als reproduzierbar. Um die Vertreter eines biologischen Konsortiums phylogenetisch zu benennen und taxonomisch einzuordnen, reichen Fingerprints alleine nicht aus. Hierzu werden weitere *Sequenzanalysen* notwendig ⁴³.

2.2.3 Sequenzbestimmung

Mit der Einführung der traditionellen Sequenzierung nach Sanger ⁴⁹ wurde eine praktikable Methode zur Bestimmung der Basensequenz aus Organismen-DNA entwickelt. Die

fortschrittlichste Form der Sanger-Methode ermöglichte die Sequenzierung von 1 kb aus 96 individuellen Spezies zur selben Zeit. Da es jedoch nicht möglich ist, mit dieser Methode mehrere Organismen in derselben Probe zu sequenzieren, ist sie nicht praktikabel für die Bestimmung von ganzen Konsortien ⁵⁰. Moderne Next-Generation Sequencing (NGS)-Technologien ermöglichen einen sehr hohen Probendurchsatz und die parallele Verarbeitung von mehreren zehn Millionen Sequenzabschnitten („reads“). Für diese Kapazität finden sich die unterschiedlichsten Anwendungen, beispielsweise zur Sequenzbestimmung ganzer Genome. In der Ökologie ermöglicht es die Bestimmung der Organismenzusammensetzung von Umweltproben mit großen Anzahlen von Individuen. Es werden PCR-Amplifikate von bestimmten Regionen erstellt und diese anschließend sequenziert. Hierzu greift man auf konservierte Regionen, bei Prokaryoten meist auf die 16S-rRNA-Gene, zurück. Die gewonnenen Sequenzen werden anschließend zur Identifikation mit umfangreichen 16S-rRNA-Sequenzsammlungen in Genbanken abgeglichen. Für Bioprozesse können beispielsweise verschiedene Anlagen und Prozessweisen verglichen oder die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft verfolgt werden ^{51–53}.

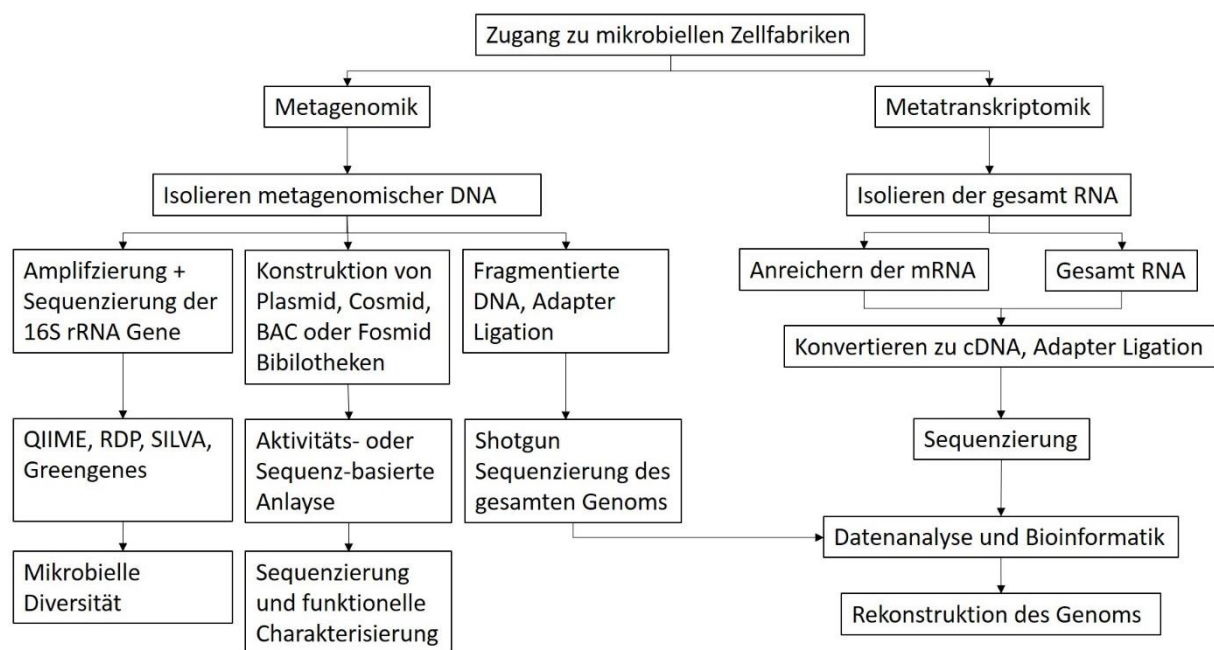


Abbildung 5: Anwendungen moderner Methoden zur Analyse mikrobieller Diversität (adaptiert aus Kalia ⁵⁴)

Der linke Pfad zeigt metagenomische Analysemöglichkeiten der DNA-Analytik. Bei RDP (Ribosomal database project), SILVA und Greengenes handelt es sich um Datenbanken mit deren Hilfe sequenzierte Abschnitte, bestimmten taxonomischen Einheiten zugeordnet werden. Hierdurch wird es möglich das Mikrobiom darzustellen. Der rechte Pfad zeigt Möglichkeiten auf, wie für die Analyse der RNA vorgefahren werden kann. Bei diesen Verfahren wird ein vorgeschalteter Schritt notwendig, in dem die (m)RNA zu komplementär DNA (cDNA) umgeschrieben wird.

Fingerprinting und Sequenzierungsmethoden stellen hilfreiche Werkzeuge zum qualitativen Nachweis von Organismen oder der Darstellung der Diversität dar und ermöglichen die quantitative Gegenüberstellung der Abundanz unterschiedlicher Fragmente oder Organismen. Für die exakte Quantifizierung bestimmter Genabschnitte, vor allem in Proben in welchen viele verschiedene Organismen erwartet werden, kommen weitere Verfahren in Frage ⁵⁵.

2.2.4 Molekulare Quantifizierung

Aus bereits aufgeführten Gründen kommen herkömmliche kulturbasierende oder mikroskopische Methoden zur Quantifizierung von Mikroorganismen aus komplexen (Umwelt-)Proben nicht in Frage. Es muss hierzu, wie auch bei der qualitativen Bestimmung, auf molekulare Methoden zurückgegriffen werden.

In der Durchführung quantitativer PCR-Analysen unterscheidet man prinzipiell zwischen zwei verschiedenen Methoden: Endpunkt-PCR (z.B. (MPN)-PCR) und die Echtzeit-quantitative-PCR (qPCR). Bei der konventionellen Endpunkt-PCR wird das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Banden über die Fluoreszenz relativ quantifiziert. Diese Methode ist technisch weniger anspruchsvoll, da kein spezielles Equipment (Cycler und Detektoren) benötigt wird. Als Schwachstellen sind jedoch die Konkurrenz zwischen Amplikons und Primern zu nennen. Zudem nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Zyklenzahl ab, da die Aktivität der Polymerase nachlässt, wenn die Anzahl der ungebundenen Nukleotide abnimmt. Hierdurch entstehen Ungenauigkeiten, da die Quantifizierung in der stationären Phase der PCR-Reaktion erfolgt ⁵⁶.

Die deutlich sensitivere qPCR umgeht diese Nachteile durch die zyklische Zunahme der Ampflifikate, die in der exponentiellen Phase erfasst und quantifiziert werden. Hierzu werden interkalierende Farbstoffe wie SYBR Green I oder spezielle Sonden eingesetzt, die an doppelsträngige DNA (dsDNA) binden und hierdurch ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Im Falle von SybrGreen entsteht ein Komplex, der bei Anregung grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$) emittiert. Die resultierende Zunahme der Fluoreszenz steigt proportional zur Kopienzahl und wird von einem Detektor in Echtzeit am Ende eines jeden Zyklusses erfasst. Eine Zusammenfassung geeigneter Primer und Sonden zur Quantifizierung methanogener Archaeen findet sich in der Literatur ⁵⁷.

Zur Prozesscharakterisierung unterscheidet man zwischen zwei häufigen Anwendungen: Soll generell mikrobielles Wachstum, zum Beispiel der gesamten Domäne der Bakterien

quantifiziert werden, verwendet man Primer, die an möglichst stark konservierte und damit in der Domäne weitverbreitete Abschnitte der 16S-rRNA-Gene anlagern ^{58,59}.

Ist das Ziel die spezifische Quantifizierung von Stämmen oder Gruppen, verwendet man spezielle Primer, die an variablen Regionen der 16S-rRNA-Gene oder an bestimmte funktionelle Gene binden.

Zur Quantifizierung methanogener Archaeen greift man häufig auf Primer für die Bindung an Sequenzen innerhalb des *mcrA*-Gens zurück ^{60,61}. Das *mcrA*-Gen kodiert für die α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase, einem Enzym, das die Reduktion des Methyl-Coenzym-M zu CH₄ und damit den letzten Schritt der Methanogenese katalysiert. Aufgrund der für die Organismen essentiellen Funktion des Gens liegen Regionen der Gensequenz hochkonserviert im MCR I-Operon vor (Abbildung 6) und sind spezifisch für methanogenen Archaeen ^{61,62}. Hierdurch vermeidet man, dass nicht methanogene Archaeen bei der Quantifizierung erfasst werden. Andere Regionen der MCR-Operons oder auch weniger konservierte Regionen des *mcrA*-Gens, die es ermöglichen spezifische phylogenetische Gruppen oder einzelne Organismen wie *Candidatus Methanoperedens nitroreducens* zu quantifizieren, sind ebenfalls bekannt ⁶³.

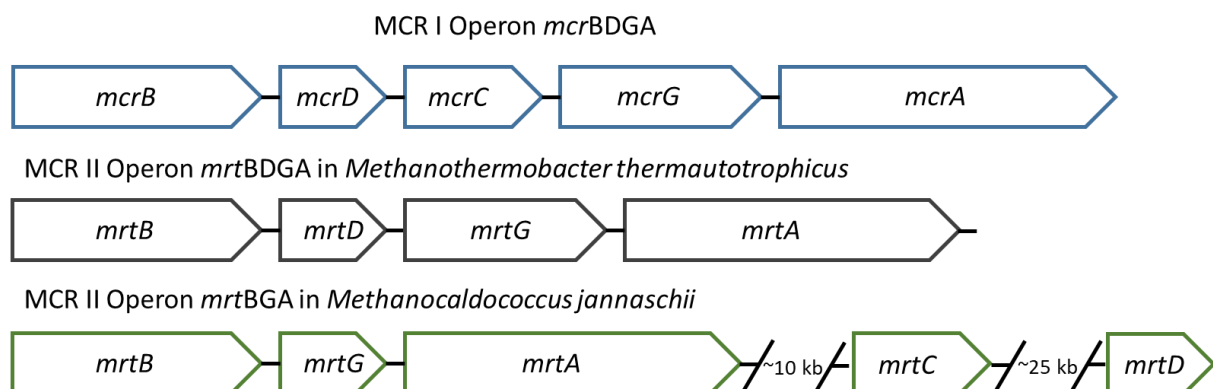


Abbildung 6: MCR I und MCR II Operons verschiedener methanogener Archaeen. (adaptiert aus Alvarado et al. ⁶⁴)

Das MCR I-Operon (*mcrBDCGA*, oben) liegt in sämtlichen methanogenen Archaeen mit nur sehr geringen Abweichungen vor, während das MCR II-Operon deutliche Varianzen zwischen unterschiedlichen Methanogenen aufweisen kann.

2.3 Gängige Reaktortypen

Reaktoren zum anaeroben Stoffabbau weisen verschiedene Bau- und Verfahrensweisen auf, die je nach Anwendung und Spezifikation des Prozesses ausgelegt werden. Es lassen sich grundsätzlich zwei Kategorien unterscheiden: Abwasserreinigung und Energiegewinnung.

Während im Abwasserbereich eine hohe Raumzeitausbeute angestrebt wird, steht im Falle der Energiegewinnung eine möglichst hohe Methanausbeute im Vordergrund ³. Im Folgenden werden Beispiele für Reaktoren zur Energiegewinnung erläutert.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen Nass- und Trockenfermentern. Die Auswahl des geeigneten Verfahrens richtet sich primär nach der Beschaffenheit der vorhandenen Substrate. Prinzipiell kann bei der Flüssigvergärung eine bessere Durchmischung erreicht werden, jedoch sind die Rührwerke wartungsintensiv und können von Feststoffen blockiert werden. Zur Trockenfermentation werden die Substrate ohne Zugabe von Wasser mit einem Trockensubstanzgehalt (TS) von ca. 20 % direkt in den Fermenter eingebracht. Das gängige Prinzip ist die Garagenfermentation (Abbildung 7). Der Fermenter besteht meist aus einem rechteckigen Beton- oder Stahlcontainer, der durch Bodenheizung auf Betriebstemperatur gebracht wird. Im Boden befinden sich eine oder mehrere Öffnungen, die ein Abfließen und Auffangen des Perkolats ermöglichen. Unter Perkolat versteht man überschüssige Flüssigkeit, die während des Gärprozesses anfällt und durch die Schüttung rieselt.

Eine Fermentationsperiode besteht aus drei Zyklen: Zunächst wird der Reaktor mit Substrat befüllt, verschlossen und mit Perkolat aus weiteren Reaktoren über einen geschlossenen Kreislauf berieselt (perkoliert). Das Perkolat dient als Inokulum zum Beimpfen des Materials und beinhaltet zudem kurzkettige Kohlestoffketten, die den Organismen als leichtzugänglich Nährstoffquelle dienen, was eine schnelle Zunahme der mikrobiellen Biomasse begünstigt. Nach den ersten 30 Tagen wird der Fermenter komplett ausgeräumt, ein Drittel des Substrates wird entfernt und ein Drittel frischen Substrates beigemischt. Dieser Vorgang wird in der Folge nochmals wiederholt. Nach ca. 90 Tagen ist die Fermentationsperiode abgeschlossen und beginnt von neuem. Da der Prozess parallel in mehreren „Garagen“ zeitversetzt durchgeführt wird, kann ein gleichbleibender, kontinuierlicher Gasvolumenstrom gewährleistet werden.

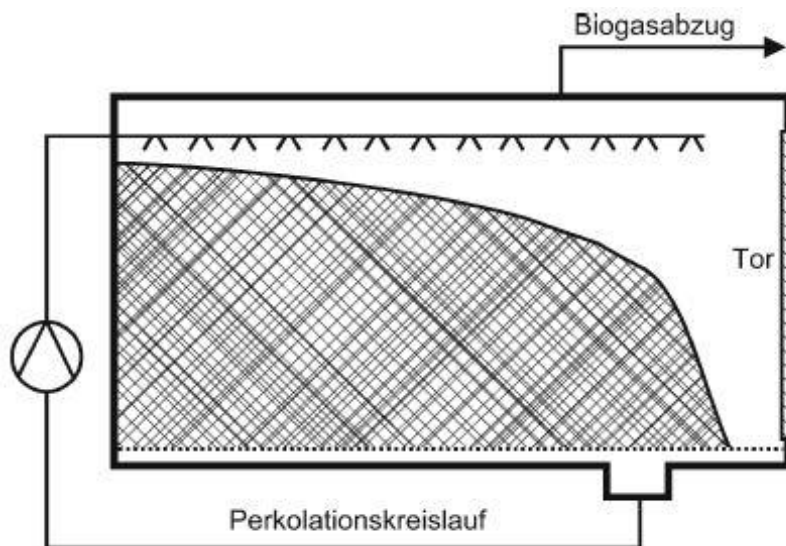


Abbildung 7: Trockenfermenter (entnommen aus Antranikian ³)

Das Substrat wird mit Radladern mit Gärrest vermisch, der Fermenter befüllt und anschließend verschlossen. Ein Teil der Hydrolyse findet bereits aerob, außerhalb des Fermenters statt. Nach Verschließen des Reaktors wird das Substrat mit Perkolat aus anderen Fermentern beimpft. Das Perkolat enthält sowohl anaerobe Mikroorganismen als auch kurzkettige C-Quellen. Ein Teil wird im Kreis geführt, ein weiterer Teil wird stetig dem Prozess entzogen und in Perkolatspeichern gesammelt, um die Standfestigkeit der Schüttung zu erhalten. Überschüssiges Perkolat wird zum Inokulieren weiterer Reaktoren verwendet oder als Flüssigdünger verwendet.

Bei der *Nassfermentation* wird das Substrat, um Pumpfähigkeit zu erreichen, durch Zugabe von Flüssigkeit im Reaktorzulauf auf einen TS von etwa 12 % eingestellt. Zur Verflüssigung wird hierbei entweder flüssiges Substrat verwendet oder Prozesswasser, das im Kreislauf geführt wird. Je nach Abbaubarkeit der Substrate stellt sich im Fermenter ein TS-Anteil von 3 bis 8 % ein ³. Je nach Anwendung kommen zur Nassfermentation verschiedene Konstruktionsarten zum Einsatz. Übliche Arbeitsvolumen liegen zwischen 500 und 8000m³. Der Linde-Laran Biogasreaktor (Abbildung 8), der zur industriellen Biogaserzeugung oder zur Vergärung flüssiger Bioabfälle eingesetzt wird, basiert auf der Einpressung von Biogas zur Durchmischung und ist damit weitgehend unempfindlich gegen Störstoffe, die auf Dauer zur Blockierung der Rührwerke führen.

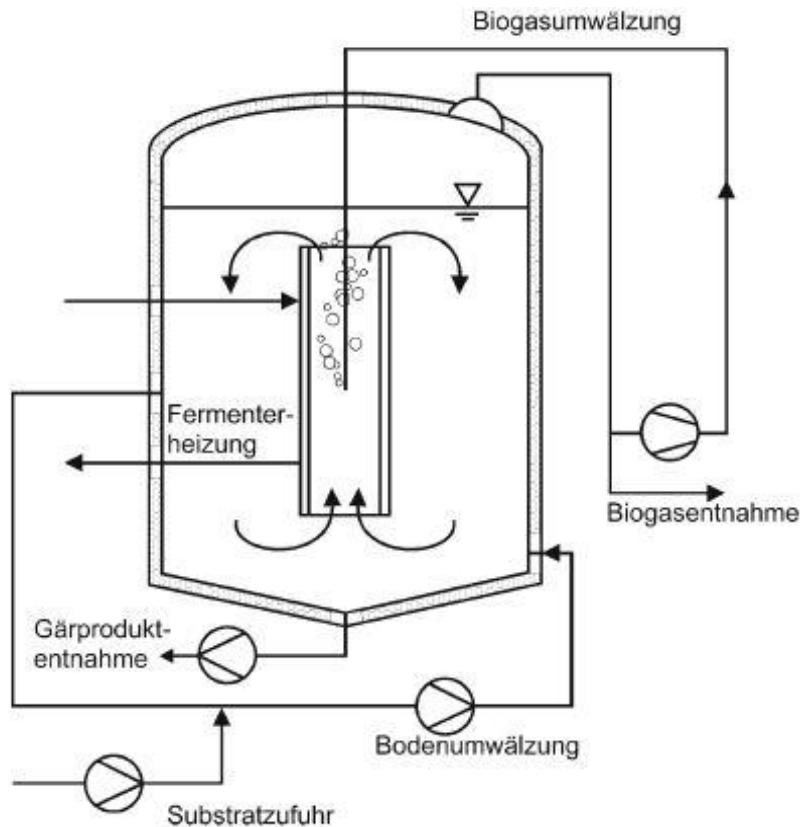


Abbildung 8: Linde-Laran-Biogasreaktor (entnommen aus Antranikian ³)

Biogas wird am Gasdom abgenommen. Das außerhalb verdichtete Gas wird durch eine Gaslanze einige Meter unterhalb des Flüssigkeitsspiegels eingepresst. Hierdurch wird am Fermenterboden befindliches Substrat in das Leitrohr angesaugt und nahe der Oberfläche wieder abgegeben. Die entstehende Kreislaufströmung durchmischt den Fermenterinhalt homogen.

Landwirtschaftliche BGAs zur Flüssigvergärung werden meist mechanisch durchmischt. Dies kann durch Tauchmotorrührwerke, die an der Reaktorwand angebracht sind oder durch vertikale Paddel- oder Schneckenrührwerke erfolgen, die das Substrat durch den Fermenter bewegen (Abbildung 9). Die Beheizungsanordnung wird meist in Form von Heizrohren an der Innenwand der Reaktoren angebracht ³. Das entstandene Gas wird in Folienbehältern aufgefangen.

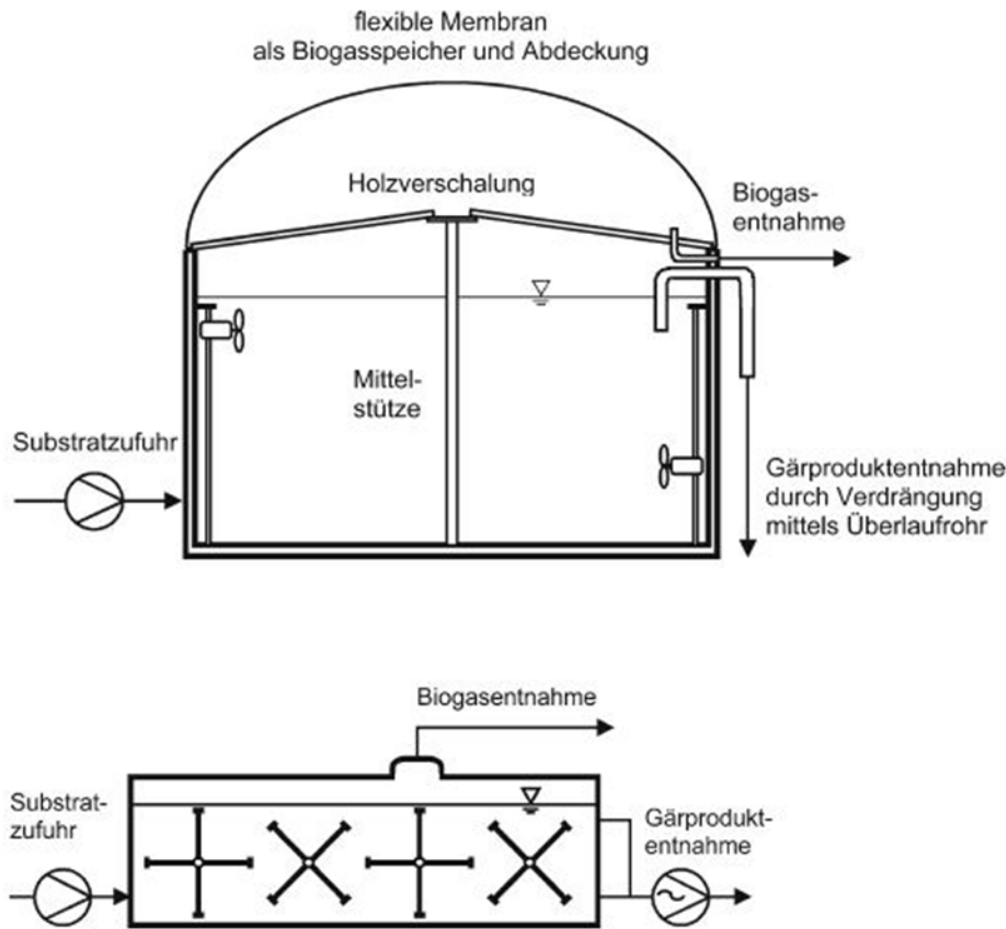


Abbildung 9: Landwirtschaftliche Biogasreaktoren (entnommen aus Antranikian ³)

Oben, landwirtschaftliche BGA (Rundbehälter). Die Durchmischung erfolgt über Tauchmotorrührwerke, die in der Höhe und Neigung verstellbar sind. Die Rührwerke werden so konstruiert, dass eine Wartung von außen möglich ist, ohne den Reaktor zu entleeren. *Unten*: Reaktor mit Paddelrührwerk. Diese Reaktoren werden meist verwendet, um Substrate mit größerem Feststoffgehalt (z.B. Mist) zu vergären.

2.4 Anlaufphase und Maßstabsverkleinerung

Während der Anlaufphase einer BGA wird eine hohe Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft erwartet, da diese mit einer Umstellung auf völlig neue Bedingungen konfrontiert wird. Es wird ein Prozess angestoßen, der einem großen Spektrum an Mikroorganismen die Gelegenheit gibt, nach und nach ein etabliertes „ökologisches“ System zu bilden. In diesem setzen sich diejenigen durch, die sich am besten an die im Reaktor herrschenden Bedingungen, wie Temperatur und Zusammensetzung des Substrats, anpassen und behaupten oder Nischen finden und diese ausfüllen können. Es bildet sich ein System aus, das es ermöglicht, komplexe Biopolymere über mehrere Stufen von Zwischenprodukten zu CH_4 und CO_2 abzubauen.

Einige wissenschaftliche Arbeiten beschäftigen sich mit der Anlaufphase von Biogas- und sonstigen Anlagen zum anaeroben Abbau unter Verwendung von verschiedenen Substraten,

darunter einige mit der Vergärung von Klärschlamm ⁶⁵. Kobayashi et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen Qualität des Inokulums und der Prozessführung während des Reaktorstarts und der späteren Prozessstabilität ⁶⁶. Weitere Arbeiten beschäftigten sich mit der Adaption der mikrobiellen Gemeinschaft sowie anderer Parameter bei Änderung der Betriebstemperatur ^{67,68}, oder mit Vorgängen während einer Überladung des Reaktors ⁶⁹.

Ebenso ist die Anlaufphase von Anlagen zur Vergärung von kommunalen und industriellen Abfällen Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Bolzonela et al. befassten sich mit der Ausarbeitung einer Strategie, die Anlaufphase einer Anlage zur Vergärung der organischen Phase von Hausmüll zu verkürzen ⁷⁰. Qu et al. erforschten mit Hilfe von ¹³C-markierten Kohlenstoffisotopen in Kombination mit Fingerprinting Methoden (ARISA und FISH) die Entstehung von CH₄ während der Anlaufphase in Laborreaktoren, die mit künstlich erzeugtem Hausmülläquivalent gefüttert wurden⁷¹. Die Ergebnisse zeigen, dass in der frühen Phase häufige Shifts in der Gemeinschaft der Archaeen zu beobachten waren. Im Zeitraum der aktiven Methanbildung blieb das ARISA-Profil jedoch konstant. Einige weitere Studien befassten sich außerdem mit der Anlaufphase bei der Vergärung von Gülle ^{72,73}.

Die Dynamik während der Anlaufphase von Anlagen zur Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen ist dagegen bislang wenig untersucht. Klang et al. stellen einen direkten Vergleich zwischen der Monovergärung von Mais- und Zuckerrübensilage an. In dieser Studie wurde die Anlaufphase im Labormaßstab nachgestellt und über einen Zeitraum von 337 Tagen beprobt ⁷⁴. Die Etablierung der Bakterien- und Archaeengemeinschaft wurde mittels TRFLP, kombiniert mit Klonieren und Sequenzieren, verfolgt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich sowohl die Bakterien- als auch die Archaeen-Gemeinschaft in Abhängigkeit von den im Substrat enthaltenen Nährstoffen entwickeln. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Störungen durch Ammonium oder abfallenden pH-Wert, der empfindliche Mikroorganismen hemmt, nicht zu einem Zusammenbruch des Prozesses führen müssen, sondern durch eine Veränderung in der Population durch weniger sensible Mikroorganismen aufgefangen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals die Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft einer landwirtschaftlichen BGA im technischen Maßstab von Beginn an verfolgt werden. Hierzu wurden neben der mikrobiellen Entwicklung die Prozessparameter, sowie Einflussfaktoren wie Temperatur Substratgabe und Substratzusammensetzung über 240 Tage verfolgt und daraus ein umfassendes Bild erstellt.

2.5 Flexibilisierung

Flexibilisierte Betriebsweise von BGAs wird als eine zukunftsweisende Technologie gesehen, mit der beispielsweise Fluktuationen im Energienetz durch die Nutzung von Sonnen- oder Windenergie ausgeglichen werden können ¹⁰. Die flexible Betriebsweise gewinnt vor allem als Option zum Ausgleich von Angebots- und Nachfrageschwankungen, die sich durch die Bedarfssituation im Verteilernetz oder am Markt ergeben, an Bedeutung. BGAs eignen sich neben der Bereitstellung von Wärme oder Strom auch aufgrund der standortgebundenen Verfügbarkeit von CO₂ für biologische Power-to-Gas Konzepte ⁷⁵. Durch eine steuerbare Flexibilisierung der Biogasproduktion entstehen Anwendungsmöglichkeiten in Dezentralisierungskonzepten (Abbildung 10). Neben der Sicherstellung der Energiesicherheit durch Ausgleich der Fluktuation und längerer Flauten ist auch eine Anpassung des Produktionsintervalls an die Stromspitzen industrieller Betriebe oder andere Großabnehmer in Umgebung der Anlage vorstellbar.

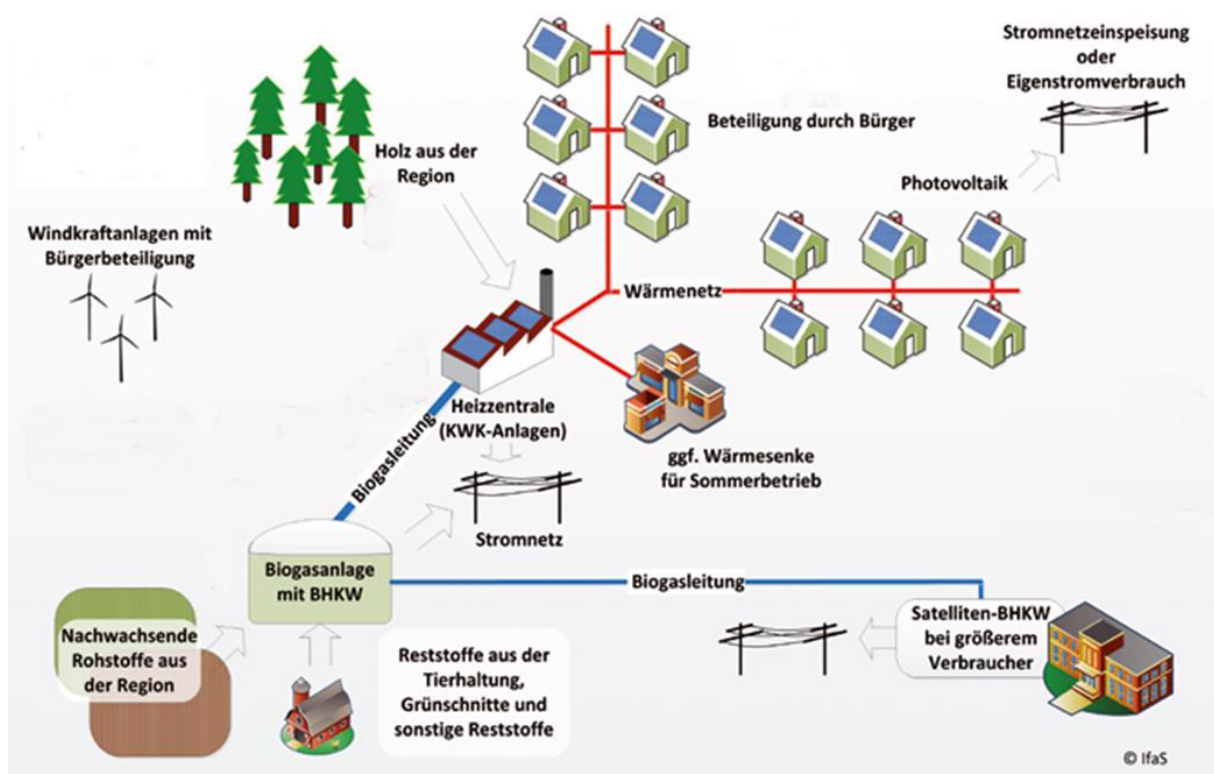


Abbildung 10: BGA in einem Dezentralisierungskonzept (adaptiert aus FNR 2014 ⁷⁶)

Zum Ausgleich der Fluktuation werden Methanspeicher eingesetzt. Großverbraucher in der Region sind mit Satelliten-BHKW ausgestattet, um Strom- und Wärmeverluste auf dem Transportweg zu reduzieren.

Flexibilisierung von BGAs kann nach verschiedenen Konzepten folgen. Eines ist die *Entkopplung* von Gasproduktion und Verwertung: Sind ausreichende Kapazitäten des BHKW-

Betriebes vorhanden, kann der Betrieb durch die Erweiterung der Gasspeicher flexibilisiert werden, indem zusätzlich gespeichertes Gas erst zu einem Zeitpunkt erhöhter Nachfrage genutzt wird ⁷⁷. Voraussetzung hierfür ist die ausreichende Dimensionierbarkeit aller gasführenden Anlagenkomponenten, zudem ist ab der Menge von 10.000 kg brennbaren Gases die Störfallverordnung zu beachten ⁷⁵.

Eine weitere Möglichkeit bietet die *Substratflexibilisierung*, bei der die Gasverfügbarkeit durch intervallartige Substratgabe gesteuert wird. Die zeitabhängige Biogasausbeute kann abhängig von den Fütterungsintervallen, der Substratmenge sowie der Substratzusammensetzung gesteuert werden. Denkbare Vorteile sind neben Substrateinsparung und längeren Standzeiten der BHKWs auch ein reduziertes Volumen der Gasspeicher sowie geringere Lagerflächen für Substrate und Gärreste.

Wie Mauky et al. anhand einer Anlage im Produktionsmaßstab zeigen, konnte durch flexible Fütterung eine Erhöhung der Flexibilität im Tagesverlauf von 50 % erreicht werden ⁷⁸. Der Prozess blieb über längere Zeit weitestgehend stabil. Mulat et al. untersuchten die Auswirkungen der Substratflexibilisierung auf die Prozessperformance und mikrobielle Gemeinschaft bei der Vergärung von Trockenschlempe ⁷⁹. Es zeigte sich, dass größere Zeitspannen zwischen den Fütterungen zu einer höheren Prozessstabilität führen. Die bakterielle Gemeinschaft war in den 81 Versuchstagen variabel, während die methanogenen Archaeen konstant blieben. Gegenstand der Forschung sind zudem alternative Modelle, bei dem Substrat in einer räumlich getrennten, vorgeschalteten Hydrolyse verdaut wird ⁷⁵. Lemmer und Krümpel untersuchten dies mittels eines Anaerobfilters, der mit getrennt hydrolysiertem Substrat gefüttert wurde ⁸⁰. Die Biogasproduktion konnte direkt durch die Fütterung beeinflusst werden, zudem wurde eine gute Prognostizierbarkeit der jeweiligen Gasausbeute erreicht. Ein weiteres Modell beschreibt die flexibilisierte Substratgabe mit getrennten Fermentern. Hierzu findet die Hydrolyse und Säurebildung in einem vorgeschalteten Reaktor statt. Anschließend wurde das Substrat gepresst und die Festphase zur kontinuierlichen Biogaserzeugung einem Rührreaktor zugeführt. Die flüssige Phase wurde in einem Tank gesammelt und zur bedarfsgesteuerten Gaserzeugung einem Festbettreaktor zugeführt. Es konnte eine Methanausbeute erreicht werden, die dem geschätzten Potential der eingesetzten Maissilage bei herkömmlicher Vergärung entsprach ⁸¹.

Um die Prozesse während der Flexibilisierung zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Reaktorlauf über eine Periode von 1000 Tagen mit unterschiedlichen Fütterungsintervallen analysiert. Kontinuierliche Prozessparameter und Stoffwechselprodukte

wurden aufgenommen. Die mikrobielle Gemeinschaft wurde mittels ARISA und NGS-Sequenzierung verfolgt.

2.6 Störstoffe und deren Umweltrelevanz

In BGAs kommen auch Stoffe vor, die zu Störungen im Biogasprozess führen, oder schädliche Auswirkungen für Gesundheit, Umwelt oder die weiterverarbeitenden Prozesse haben. Störstoffe können durch das Substrat oder Verunreinigungen im Gärhilfsmittel in den Reaktor gelangen oder dort gebildet werden. Im Folgenden wird die Rolle von Mikroplastik und Arsen als Störstoffe näher erläutert.

2.6.1 Mikroplastik

Bei der Vergärung von organischen Materialien entstehende Endprodukte werden als Dünger in den Kreislauf zurückgeführt. Da bei Vergärungsprozessen hauptsächlich eine Reduktion des Kohlenstoffanteils durch Transfer in die Gasphase stattfindet, bleiben wichtige Pflanzennährstoffe wie Stickstoff und Phosphat sowie wichtige Spurenelemente größtenteils in der Flüssig-/Fest-Phase erhalten. Die Gärreste werden direkt als Dünger verwendet oder nach einer aeroben Nachbehandlung als Kompost bzw. vermischt mit Böden als Komposterde an Gärtnereien, Landwirte oder Privatabnehmer abgegeben.

Neben der Erzeugung von Biogas aus landwirtschaftlich erzeugten Substraten (Energiepflanzen) steigt die Nutzung organischer Abfälle aus Haushalten („Biotonne“) und gewerblichen Abfällen, Speiseresten, der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie stetig. Diese Reststoffe werden zu einem Großteil auf herkömmlichem Wege kompostiert. Das entstehende, stark klimaschädliche CH_4 (25x CO_2 -Äquivalent) gelangt meist ungenutzt in die Umwelt ⁸². Eine gezielte und kontrollierte Erzeugung von CH_4 in BGAs und die anschließende Einspeisung als Biomethan bzw. vollständige Nutzung erzeugter elektrischer und thermischer Energie kann zu einer deutlichen Einsparung von Treibhausgasen führen ⁸³. Dies führt seit 2010 zu einem schnellen Ausbau der Kapazitäten zur Nutzung biogener Abfallstoffe in BGAs, während die verarbeitete Menge in Kompostieranlagen seit 2007 abnimmt (Abbildung 11).

Neben den unbestrittenen Vorteilen, die eine Kreisführung biogener Abfälle mit sich bringt, besteht der Verdacht, dass diese einen Vektor für umweltschädliche Kunststoffe in terrestrische Ökosysteme darstellen.

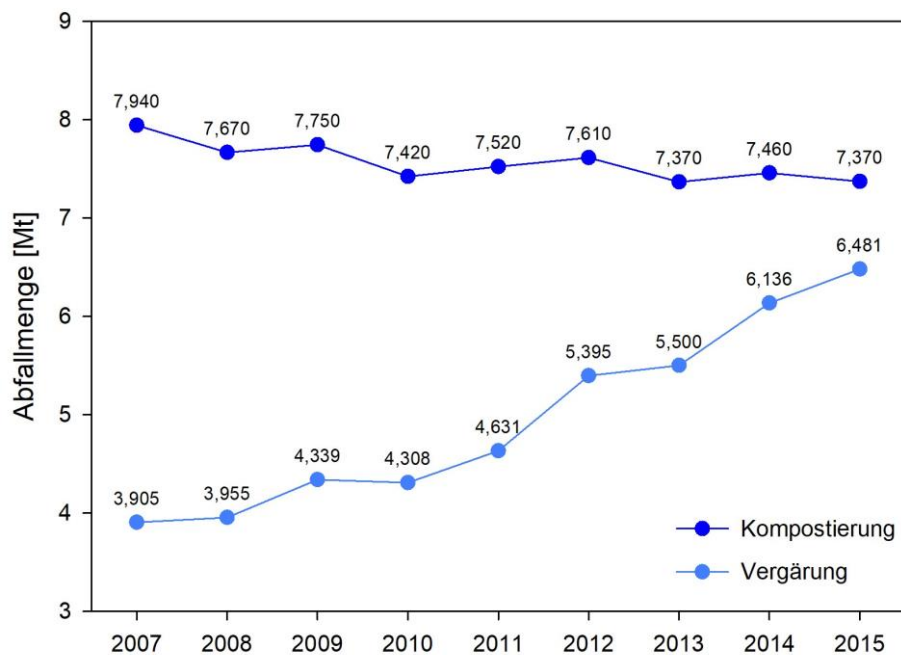


Abbildung 11: Menge des in Behandlungsanlagen eingesetzten Bioabfalls in Deutschland.
(adaptiert aus: Statistisches Bundesamt (ID 257365))

Anwendungsgebiete und Kennzahlen: Begründet durch eine Vielzahl von Vorteilen, die Kunststoffe durch ihre variablen Materialeigenschaften mit sich bringen, haben diese Einzug in fast alle Bereiche des Alltags gefunden. Den größten Anteil von 39,9 % machen Verpackungsmaterialien aus. Weitere große Anwendungsgebiete finden sich im Baubereich, in Elektronik, Automobilbranche, Konsumartikeln, Möbeln, Sport und Sicherheit sowie in der Medizinbranche ⁸⁴. Dies führte zu einer jährlichen Zunahme der weltweiten Plastikproduktion seit 1950 auf eine Produktion von 322 Millionen Tonnen im Jahre 2015, wovon ein Anteil von 40 % Einwegprodukte waren. 80 % des produzierten Plastiks entfallen auf Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC), Polystyren (PS), Polyethylenterephthalat (PET) und Polyurethan (PU) ⁸⁴. Eine aktuelle Studie prognostiziert einen weiteren Anstieg, der zu einer Vervierfachung der weltweiten Plastikproduktion in den nächsten 30 Jahren führen könnte ⁸⁵.

Umweltrelevanz und Eintragswege: Aufgrund unzureichender Entsorgung enden viele Kunststoffe in der Umwelt, wo sie mittlerweile zu einem ernsthaften Problem geworden sind. Das „World Economic Forum“ schätzt, dass 32 % des Plastiks, das als Verpackungsmaterial in Umlauf kommt, in der Umwelt landet ⁸⁶. Verschiedene Modelle suggerieren, dass durch terrestrische Quellen jährlich 12,7 Millionen Tonnen an Plastikmüll in den Ozeanen enden, wo

es für hunderte von Jahren weiterexistiert und an den Küsten wie auch in den maritimen Regionen Schaden zufügt ⁸⁷.

Plastik, das in der Umwelt landet, wird nach und nach zu kleinsten Partikeln degradiert und abhängig vom Polymertyp sowie den jeweiligen Umweltbeschaffenheiten abgebaut oder nach und nach zerkleinert. Hierbei entstehen neue funktionelle Gruppen an der Oberfläche, die anderweitig reagieren (Abbildung 12). Dieser Prozess wird durch die Interaktion mit UV-Strahlung, mechanischer Beanspruchung, chemischem und biologischen Abbau vorangetrieben ^{88,89}.

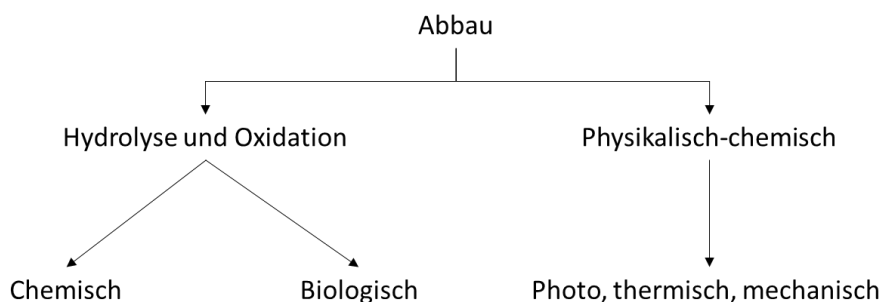


Abbildung 12: Abbauwege von Polymeren in der Umwelt (adaptiert aus Fotopoulou ⁸⁸)

Erreichen die Partikel eine Größe < 5 mm, spricht man von Mikroplastik, welchem eine Vielzahl von schädlichen Eigenschaften zugeschrieben wird. Durch Mikroplastik kann es zur Schädigung von Flora und Fauna kommen, welche durch die Partikel selbst beziehungsweise eine Anreicherung von Schadstoffen auf den Partikeln, sowie durch die Ansiedelung von pathogenen Mikroorganismen auf den Partikeln erfolgen, die zu einer Änderung der Mikrofauna in den betroffenen Gebieten führt ^{89–91}. Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Mikroplastikpartikel aufgrund ihrer geringen Größe vermutlich Einzug in die Nahrungskette genommen haben und in Wirbeltieren, Fischen und Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten. Hieraus kann vermutet werden, dass Mikroplastikpartikel auch ihren Weg in menschliche Nahrungsmittel gefunden haben ^{92–94}.

Neben maritimen Lebensräumen wurden auch signifikante Mengen an Mikroplastik in Frischwassersystemen nachgewiesen ^{95–97}. Obwohl Mikroplastik mittlerweile ubiquitär ist und in Konzentrationen von bis zu 100.000 Partikeln m^{-3} Gewässern vorkommt, ist wenig über die Eintragswege bekannt.

Bisher werden als Eintragswege in Oberflächengewässer unsachgemäße Entsorgung, Wind, kommunales und industrielles Abwasser sowie Klärschlamm diskutiert ^{97,98}. Detaillierte

Studien zu Eintragswegen und Mechanismen, die zu Mikroplastik in terrestrische Ökosysteme führen, fehlen bisher weitgehend.

In der vorliegenden Arbeit wurden Dünger, die aus der Kompostierung und Biogaserzeugung aus verschiedensten Ausgangsmaterialien stammen, als potentielle Eintragswege für Mikroplastikpartikel in die Umwelt untersucht und eine Einschätzung des davon ausgehenden Potentials als Eintragsquelle abgeschätzt.

2.6.2 Metalloide

Arsen, das ubiquitär in der Umwelt vorkommt, aber auch durch andere Faktoren in größeren Mengen in BGAs gelangen kann, wird dort von Mikroorganismen zu neuen Verbindungen umgewandelt. Die entstehenden Verbindungen liegen unter anderem auch gasförmig vor. In der Promotionsarbeit sollte erforscht werden, welche Verbindungen in einer BGA unter anoxischen Bedingungen entstehen, und wie sich diese auf die Gärbiologie und den Prozess auswirken. Zudem sollte abgeschätzt werden, ob eine Gefährdung für Mensch und Umwelt besteht. Außerdem wurde vermutet, dass durch volatile As-Spezies eine Einschränkung für nachfolgende Prozesse zur Gasverwendung entsteht.

Arsen wird zur Gruppe der Metalloide gezählt. Unter diesem Begriff werden Elemente im Periodensystem zusammengefasst, die zwischen der Gruppe der Nichtmetalle und der der Metalle stehen und Eigenschaften beider Gruppen teilweise innehaben können⁹⁹. Arsen kommt im Wesentlichen in den vier Oxidationsstufen –III, 0, +III und +V als anorganische und organische Spezies vor. Die vorherrschende Form ist von der Anzahl der Sorptionsmittel, dem pH-Wert, dem Redoxpotential sowie der mikrobiellen Aktivität abhängig. Die Oxidationsstufe –III kommt nur unter stark reduzierenden Bedingungen und die metallische Form der Stufe 0 nur sehr selten vor. Die Oxidationsstufe +III ist häufig unter anoxischen Bedingungen, die Stufe + V unter oxischen Bedingungen anzutreffen^{100,101}.

Als Bestandteile der Erdkruste gelangen anorganische Arsenverbindungen auf verschiedenen *natürlichen Wegen* (z.B. Verwitterung und Korrosion von arsenhaltigem Gestein) in die Umwelt, wo sie in Gewässern, Böden und der Luft gefunden werden^{101–105}. Die durchschnittliche Arsenkonzentration in der Erdkruste beträgt ca. 3,4 mg kg⁻¹, die durchschnittliche Belastung von unkontaminierten Böden weltweit durchschnittlich 5-6 mg kg⁻¹^{106,107}. Je nach geologischer Beschaffenheit können die Werte regional deutlich schwanken. So konnten beispielsweise für Böden in der Heubachniederung (NRW) oder in bayrischen Torfmooren deutlich höhere Konzentrationen gefunden werden.

Konzentrationen von $>50 \text{ mg kg}^{-1}$ TS wurden nachgewiesen ¹⁰⁸. Die Arsenbelastung der Böden hängt stark von der vorherrschenden Bodenart ab. Die höchsten natürlichen Werte finden sich meist in Moor und Sumpfgebieten. In Bayern konnten Werte von 156 mg kg^{-1} TS in Niedermoortorf, der als Acker und Grünland genutzt wird, nachgewiesen werden ¹⁰⁹. In Tabelle 3 sind die Prüfwerte nach Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV) dargestellt. Menschengemachte Faktoren wie Bergbau, Verbrennung fossiler Brennstoffe, industrielle Prozesse, Mülldeponien und Pestizide tragen ebenfalls zu einem wesentlichen Eintrag in die Umwelt bei ^{101,110–112}.

Tabelle 3: Prüfwerte für Arsen (BBodSchV)

Prüfwerte für Arsen [mg kg^{-1} TS] für den Belastungspfad Boden - Mensch			
Kinderspielflächen	Wohngebiete	Park- u.- Freizeitanlagen	Industrie- u. Gewerbegrundstücke
25	50	125	140

Als Eintragswege verschiedener Arsenverbindungen in BGAs kommen artifizielle *Dünger*, belastete *Pflanzen*, sowie *Gärhilfstoffe* in Frage:

Arsen wird durch *Düngemittel* in landwirtschaftlichem Ackerbau freigesetzt. Studien belegen, dass Phosphatdünger im europäischen Schnitt $7,6 \text{ mg kg}^{-1}$ As enthalten¹¹³. Nach Düngemittelverordnung besteht ab 20 mg kg^{-1} eine Kennzeichnungspflicht, die zulässige Höchstgrenze liegt bei 40 mg kg^{-1} ¹¹⁴. As wird anschließend durch Pflanzen aufgenommen ^{115–}¹¹⁹ und gelangt auf diesem Wege in die BGA.

Es wird vermutet, dass weiteres Arsen durch *Gärhilfsmittel* und Spurenelementlösungen in die Anlagen eingebracht wird. Damit die Vergärung effizient erfolgen kann, benötigen die beteiligten Mikroorganismen neben Makronährstoffen und Vitaminen auch Spurenelemente. Diese erhalten sie aus dem Substrat und/oder durch Zugabe von Mineralstoffen. Gerade landwirtschaftliche BGAs mit ihrem relativ engen Gärsubstratspektrum benötigen in der Regel Spurenelementgaben für den optimalen Betrieb. Die Gärhilfsmittel werden entweder als einzelne Komponenten, oder als auf dem Markt erhältliche Fertigmischungen angewendet. Typische Zusätze sind unter Anderem Spurenelemente (Fe, Co, Ni, Se, Zn), Adsorbentien wie Zeolithe, Tonmineralien und Aktivkohle sowie verschiedene Enzyme oder hydrolytische Mikroorganismen ¹²⁰.

Kenntnisse über Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Arsenverbindungen, die zur Bildung volatiler Verbindungen führen, reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück, als immer wieder Fälle von Vergiftungen dem beispielsweise in Wandfarben verwendeten Arsen zugeschrieben wurden. Folgende Untersuchungen ergaben einen Zusammenhang zwischen knoblauchartigem Geruch und dem Bewuchs arsenoxidhaltiger Medien mit bestimmten Pilzen. Kurz darauf wurde der Marsh-Test entwickelt, der den chemischen Nachweis der Bildung gasförmigen Arsens ermöglichte ^{121,122}.

Heute sind eine Vielzahl von Eukaryoten und Prokaryoten bekannt, die in der Lage sind, durch Biomethylierung, Arsenverbindungen eine oder mehrere CH₃-Gruppen anzuhängen und sowohl volatile wie auch nichtvolatile Verbindungen zu bilden. Es sind Mono(MMA)-, Di(DMA)- und Trimethyl(TMA)-Arsene, die sowohl aus der +III wie auch der +V Form gebildet werden, und hydrierte Arsinverbindungen bekannt. ¹²². Der Challenger-Mechanismus als wichtiger Weg der Methylierung ist in Abbildung 13 dargestellt.

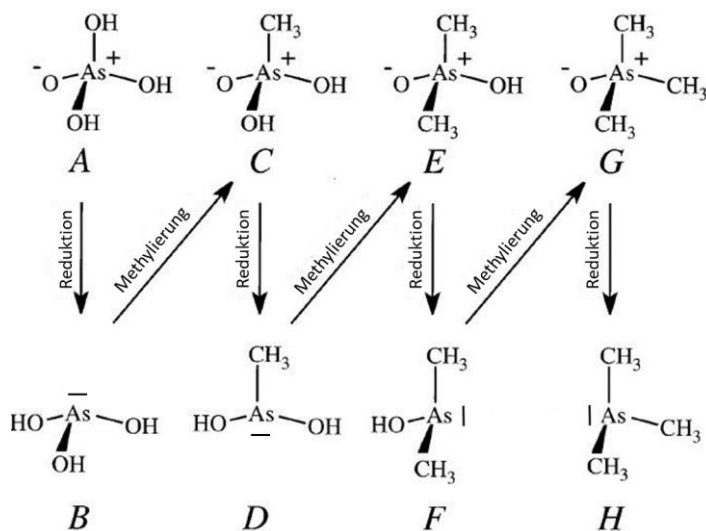


Abbildung 13: Challenger Mechanismus der Konversion von Arsenat zu TMA (adaptiert aus Bentley und Chasteen ¹²²)

(A) Arsenat; (B) Arsenit; (C) Methylarsinat, (D) Methylarsinit; (E) Dimethylarsinat; (F) Dimethylarsinit; (G) Trimethylarsinioxid; (H) Trimethylarsin. Die Obere Reihe zeigt die As(V)-Intermediaten. Die vertikalen Pfeile veranschaulichen die Reduktionsmechanismen zu den As(III) Intermediaten, die schrägen Pfeile zeigen die Methylierungsschritte mittels S-Adenosinmethionin (SAM) als Methyl donor.

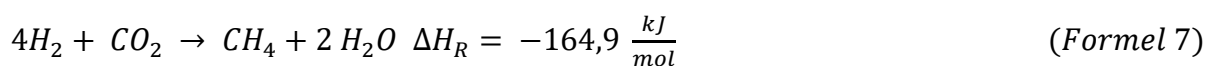
Methylierungsreaktionen werden auch in BGAs erwartet, da die Arsenverbindungen dort auf ein hochaktives, hochdiverses und dicht gewachsenes Konsortium von Mikroorganismen treffen. Hieraus werden unterschiedliche Effekte vermutet, die durch Biomethylierungen entstehen:

Mensch und Umwelt: Toxische Eigenschaften des Arsens sind bereits seit langem bekannt und nachgewiesen. Der Kontakt kann zu gesundheitlichen Langzeitschäden wie Haut- und Lungenkrebs, Hypertonie, Herz-Kreislaufkrankheiten sowie neurologischen Schäden führen¹²³. Die Toxizität hängt jedoch stark von der chemischen Beschaffenheit des Arsens ab. Die am giftigsten eingestuften Verbindungen finden sich unter den Arseniten (AsIII), den anorganischen Verbindungen wird wiederum eine deutlich stärkere Toxizität als den organischen Verbindungen beigemessen^{103,124}. Unter den stark reduzierenden Bedingungen im Zellinneren werden in erster Linie methylierte Arsenitbindungen der Oxidationsstufe +III gebildet¹²⁵.

In manchen Fällen kann durch die Methylierung die Toxizität, in jedem Falle aber die Mobilität, der Arsenverbindungen erhöht werden. Richtwerte für die maximal in landwirtschaftlichen BGAs noch tolerierbaren Konzentrationen dieser (teil)methylierten Metaboliten gibt es derzeit nicht.

Gasausbeute und Methangehalt: Studien mit methanogenen Reinkulturen belegen die Bildung methylierter Metalloidverbindungen in Konkurrenz zur Methanbildung, was sich letztlich in einer Volatilisierung dieser Elemente äußert. Im Falle von Arsenverbindungen ist bekannt, dass in einer Nebenreaktion zur Methanbildung Methylgruppen von Methylcobalamin auf das Arsen übertragen und dabei zuerst lösliche methylierte Arsenverbindungen und schließlich, nach mehrfacher Wiederholung dieser Reaktion, flüchtige Derivate gebildet werden¹²⁶. Die übertragenen Methylgruppen stammen direkt aus dem Stoffwechselpfad der Methanogenese und werden der Zelle noch vor dem energiekonservierenden Schritt entzogen. Daher ist die Möglichkeit eines direkten negativen Effekts auf die Methanbildung gegeben. Zudem wird vermutet, dass bestimmte Arsenverbindungen und -konzentrationen zur Hemmung verschiedener Organismen führen. In diesem Fall würde das komplexe Abbaukonsortium in einer BGA gestört, was zur Anreicherung bestimmter Zwischenprodukte und letztendlich zu einem Einbruch der Gasproduktion führen würde.

Gasnutzung: Die Nachfrage nach Energiespeichern, die zum Ausgleich fluktuierender erneuerbarer Energien benötigt werden, steigt stetig. Das Konzept der technischen Methanisierung zur Aufwertung des Biogases auf Erdgasqualität sieht vor, mit Hilfe des Sabatierprozesses¹²⁷, zusätzlichen H₂ (aus der Hydrolyse) katalytisch mit dem restlichen CO₂-Anteil des Biogases zu CH₄ umzusetzen (Formel 7).



Die stark exotherme Reaktion wird in der Praxis mithilfe eines Ni-Katalysators durchgeführt. Der Kontakt von As mit Ni führt ebenfalls zu einer irreversiblen Bindung, die in der Folge zur Blockierung der reaktiven Oberfläche führt. Dieser Effekt kann abhängig von Konzentration und Anwendungszeit zum Funktionsverlust des Nickelkatalysators führen.

3. Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

In Tabelle 4 ist eine Auflistung der im Labor verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
96-Well-Mikrotiterplatten	Greiner	Bio-One
Analysensiebe	Retsch	Analysensieb ISO 3320/1
ATR-Spektrometer	Bruker	Tensor 27
Tischautoklav	Systec	V-150
Autoklav	Systec	3850 EL
Bead Tubes	Macherey-Nagel	NucleoSpin Type A
Bildkammer	Kodak	EDAS 290
Biogasanalysator	Geotech	Biogas 5000
Falcon Tubes	Greiner	
Feinwaage	Ohaus	EO 1140
Heizmatte	Hillesheim	HSMT
Gasbeutel	Tedlar PLV	Sigma-Aldrich
Gaschromatograph	Agilent	6890N
Gasspürpumpe	Dräger	Accuro
GC-Autosampler	Agilent	7683B
GC- Kapillarsäule	Macherey-Nagel	OPTIMA FFAP
GC-Spritze	Agilent	ALS syringe
Elektrophorese-Kammer	Consort	E835
Homogenisator	MP Biomedicals	FastPrep-24
Inkubator	Eppendorf	ThermoMixer F1.5
Inkubator	Heraeus	Function Line 6000
Kamera (Mikroskop)	Olympos	CAM-SC50
Küvetten	Brand	Einmal-Küvetten PE

Kolbenhubpipetten	Eppendorf	Research plus
Leitfähigkeitsmessung	VWR International	Qcond2400
Magnetrührer 6-stellig	Fisher Scientific	TELESYSTEM 06.40
Magnetrührer Ansteuerung	Fisher Scientific	Telemodul 20C
Membranfilter	Whatman	ME24
Mikroskop	Olympus	BX51
Millipore Anlage	Synergy	SimPak2
Nylonfilter	Macherey-Nagel	CHROMAFIL Xtra
PCR-Cycler	Thermo Scientific	PxE 0.5
pH-Meter	VWR-International	pH10
pH-Meter	Consort	E835
Photometer	Eppendorf	BioPhotometer plus
Pipette (automatisch)	Integra	VIAFLO
Plate reader	Tecan	GENios Pro
Plattenzentrifuge	Heraeus	Multifuge 3 L-R
Pumpe	Gilson	Miniplus 3
Pumpe	Ismatek	ISM381C
qPCR-Cycler	Stratagene	Mx3000P
Rhizon Bodenfeuchtprobennehmer	Eijkelkamp	MOM 192121
Ringlicht	Olympus	EL-RL-P LED
Schüttelinkubator	Thermo Scientific	Formal Orbital Shaker
Spektralphotometer	Beckman-Coulter	DU 530
Spektralphotometer	Thermo Scientific	ND 2000
Spritzennadeln	Braun	Sterican
Stereomikroskop	Olympus	SZX-ZB7Stereo Zoom
Sterilbank	Waldner	FAZ 3
Sterilfilter	Sartorius	Minisart
Thermostat	Sygonix	Universal Thermostat
Universalwaage	Sartorius	BP 2010 S
UV-Lichtquelle	Fisherbrand	FT-20/312
Vortexer	Scientific Industries	Genie 2
Zellulose-Filter	Watman	
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge fresco
Zentrifuge	Thermo Scientific	LYNX 6000

3.2 Chemikalien

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Ethylbuttersäure	Merck
Arsenit	Merck
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth
Chloroform	Sigma - Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma - Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
Dimethylarsensäure	Merck
Ethanol	Merck
Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid (CTAB)	Sigma - Aldrich
Isoamylalkohol	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Monomethylarsonsäure	Argus Chemicals
Natriumchlorid	Merck
Phenol	Applichem
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka
Trimethylarsenoxid	Argus Chemicals

3.3 Software

Tabelle 6 zeigt eine Auflistung der verwendeten Software.

Tabelle 6: Verwendete Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
ChemStation	B.01.03 [204]	Agilent
LabVIEW		National Instruments
Stream	2.1	Olympus
Opus	7.2	Bruker
Quiime	1.9.1	QIIME development team
Quiime2	2018.2	QIIME 2 development team
SnapGeneViewer	4.1.4	GSL Biotech LLC
Stream	2.1	Olympus

3.4 Oligonukleotide

Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und deren Sequenz.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Referenz
BAC338F	5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3'	128
BAC805R	5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3'	128
U341F	5'NNNNNNNNNNCCTAYGGGRBGCASCAG-3'	128
U806R	5'-NNNNNNNNNNNGGACTACNNGGGTATCTAAT-3'	128
mlas	5'-GGTGGTGTMGGDTTCACMCARTA -3'	61
mcrA-rev	5'-CGTTCATBGCAGTAGTTVGGRTAGT-3'	61
ITSF	5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'	129
ITSReub	5'-GCCAAGGCATCCACC-3'	129
	5'-TGAAGC	
16S-RIS-M	TGGAAT(CG)CGTAGTAATCGC-3'	47
	5'-CTAAGATGTTTCAAT(CT)C(CGA)	
23S-RIS-M	(CG)(AGTC)(AG)(CG)GTTCC-3'	47

3.5 Laborreaktoren, technische Anlagen und Probennahme

Aufgrund komplexer Anforderungen an die Proben- und Anlagenbeschaffenheit wurde auf eine Reihe verschiedener Anlagen im technischen Maßstab sowie verschiedener Versuchsaufbauten im Labor zurückgegriffen. Ebenfalls war es wichtig, die Durchführung und die Probenahme auf den jeweiligen Versuch abzustimmen. In Abbildung 14 sind die geographischen Standorte, in Tabelle 8 die Bezeichnungen und Substrate der Anlagen, die in der Promotionsarbeit untersucht wurden, dargestellt. Ist in der Tabelle als Entnahmestelle nur Fermenter angegeben, so handelt es sich um ein einstufiges Vergärungsprinzip. Mit Ausnahme von Anlage 10, hier war die Entnahmevorrichtung am Nachgärer aus technischen Gründen nicht zugänglich.



Abbildung 14: Geografische Standorte der untersuchten Anlagen (Karte erstellt mit www.google.com/maps)

Die der Bezifferung zugeordneten Anlagen sind in Tabelle 8 ersichtlich. Die roten Markierungen zeigen Biogasanlagen, die gelben Markierungen stehen für Kläranlagen.

Tabelle 8: Anlagen, Substrate und Entnahmestellen

Bezeichnung	Entnahmestelle	Substrat
1	Fermenter, Nachgärer	A B C
2	Fermenter	A B C E
3	Fermenter, Nachgärer	A D
4	Fermenter, Perkolierung	A C
5	Fermenter, Nachgärer	A E
6	Fermenter	A B
7	Fermenter, Nachgärer	A C E
8	Fermenter, Nachgärer	A B E
9	Fermenter	B G
10	Fermenter	A B
11	Fermenter, Nachgärer	A B
12	Fermenter, Nachgärer	A C E
13	Fermenter, Nachgärer	B C D
14	Faulturm	H
15	Faulturm	H
16	Kompost, Perkolierung	A,D,F
17	Kompost - gekauft	F, G
18	Flüssigdünger - gekauft	F

A = NaWaRo, B = Gülle, C = Mist, D = LPM (Landschaftspflegematerial), E = Körnerschrot, F = Bioabfall, G = Sonstiges, H = Klärschlamm.

Folgende Kapitel beschreiben die Anlagen, den Aufbau von Laborreaktoren sowie die Vorgehensweise bei der Probenahme.

3.5.1 Reaktor zur Untersuchung der Anlaufphase

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Entwicklung zusammen mit den prozesscharakterisierenden Parametern während der Anlaufphase wurde eine technische Anlage (Anlage 5) zur Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen für 240 Tage nach dem Start beprobt.

Anlage: Bei der Biogasanlage handelte es sich um ein Standardsystem (EUCO Titan 185 AIO, Schmack Biogas GmbH), das aus einer 30 m² Pasco-20-CR-Einheit für die Einbringung von Substraten, einem 400 m³ EUCO 400-TS-Fermenter mit einem Haspelrührwerk und einem ebenfalls gerührtem 1000 m³ COCCUS-Nachgärer besteht. Der Nachgärer ist dem Fermenter nachgeschaltet, sodass Substrat aus dem Fermenter kontinuierlich in den Nachgärer gepumpt und dort weiter vergoren wird. Abhängig von der Substratbeschaffenheit variiert die Verweilzeit im Reaktor zwischen 110 und 125 Tagen.

Beide Kompartimente sind mit Heizsystemen ausgestattet. Die Betriebstemperatur im Beprobungszeitraum betrug zwischen 42 und 45° C. Die Anlage verarbeitet eine durchschnittliche Substratmenge von 3200 t Maissilage zusammen mit 200 t Körnerschrot und einer variablen Menge an Grassilage und produziert 2600 m³d⁻¹ Biogas mit einem durchschnittlichen CH₄-Gehalt von 55 %.

Inbetriebnahme der Anlage: Um die Anlage anzufahren, wurde Gärrest im Nachgärer mit Wasser vermischt. In den zehn darauffolgenden Tagen wurde die Mischung zwischen Fermenter und Nachgärer mehrmals hin und her gepumpt. An Tag 14 wurde die Anlage mit Fermenterinhalt einer im Betrieb befindlichen Anlage inokuliert. Dieser Zeitpunkt wird im Folgenden als *Tag0* bezeichnet. Fünf Tage später wurde die Anlage erstmals mit Substrat (Maissilage) beschickt. Dieser Zeitpunkt wird als *Tag1* bezeichnet. Zusätzlich wurden 160 kg Eisen-II-Chlorid zur Schwefelfällung und 200 kg Harnstoff als leichtverfügbare Stickstoffquelle zugegeben. Die ersten 100 Betriebstage wurde die Anlage ausschließlich mit Maissilage gefüttert (ca. 8-11 t d⁻¹). Anschließend wurde das Substrat um eine tägliche Zugabe zwischen 1 und 7 t Grassilage und ab Tag 160 um 0,4-1 t d⁻¹ Körnerschrot ergänzt

Probenahme: Es wurden wöchentlich Proben von 500 mL aus Fermenter und Nachgärer entnommen. Hierzu wurden die Leitungen zunächst geöffnet und gespült, um eine repräsentative Probe aus den Behältnissen zu erhalten. Proben zur *biologischen Analyse* wurden vor Ort in 10 mL Gefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Institut wurden die Proben zur DNA-Extraktion bei -20° C gelagert.

3.5.2 Trockenfermentation: Technische Anlage und Modellkonstruktion

Um die Dynamik der mikrobiologischen Gemeinschaft im Labor- und im technischen Maßstab vergleichen zu können, wurde ein möglichst maßstabsgetreues Modell eines Garagenfermenters (Anlage 4) konstruiert. Eine Außenansicht der Anlage, sowie die Innenansicht einer Garage mit vergorenem Inhalt ist in Abbildung 15 dargestellt.

Betriebsweise der technischen Anlage: Die Anlage besteht aus acht voneinander getrennten, rechteckigen Garagenreaktoren. Diese haben jeweils ein Volumen von 840 m³ und werden zu ca. 2/3 mit Substrat befüllt. Dies entspricht einer Substratmenge von 150 t pro Fermenter, aus der in einem Zeitraum von 30 Tagen ca. 20.000 m³ Biogas mit einem Methangehalt zwischen 56 und 60 % erzeugt werden. Die Fermenter werden mit einer Bodenheizung auf einer Betriebstemperatur zwischen 42 und 45° C gehalten. Ein am Boden befindliches Rohrsystem führt das entstehende Perkolat ab, um die Standfestigkeit des Fermenterinhalts zu gewährleisten.

Als Substrate werden Maisilage, Grassilage und Mist aus Kuhdung verwendet. Die acht Reaktoren der Anlage werden parallel zueinander diskontinuierlich betrieben.



Abbildung 15: Trockenfermenter (Außen- und Innenansicht)

Substrat und Probenentnahme: Für den Laborreaktor wurden anfangs ca. 15 kg angemischtes Substrat genommen, und im Anschluss jeweils ca. 5-6 kg für die weiteren Zyklen. Des Weiteren wurden ca. 5 L Perkolat aus der Hauptleitung entnommen. Dies diente zum Animpfen des Reaktors, für die mikrobiologischen Untersuchungen, sowie für die Fettsäureanalytik. Für spätere Analysen wurden jeweils 2 x 50 mL des Perkolats in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert.

Reaktor im Labormaßstab: Um die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf den Biogasprozess zu simulieren, wurde das Modell eines Garagenfermenters im Labormaßstab (Abbildung 16), basierend auf einem Reaktor im technischen Maßstab (Anlage 4), konstruiert.



Abbildung 16: Trockenfermenter im Labormaßstab (Außen- und Innenansicht)

Als Material wurde zur Wärmeleitung und chemischen Beständigkeit Edelstahl gewählt. Dieses wurde nach außen mittels Styroporplatten wärmegeklämt. Um eine ausreichende Temperaturversorgung während des mesophilen Betriebs zu gewährleisten, wurde der Reaktor, analog zum technischen Betrieb, mittels Bodenheizung erwärmt. Hierzu wurde eine Heizmatte (HMST, Hillesheim GmbH) verwendet, die durch einen Raumthermostat mit Zwischenstecker und Temperaturfühler (38928C, Sygonix GmbH) geregelt wurde. Die Heizmatte war zum

Boden mithilfe einer ca. 10 cm dicken Schicht aus Glaswolle gegen Wärmeverlust isoliert. Eine Konstruktionszeichnung des Reaktors ist in Abbildung 17 dargestellt. Es waren zwei Ein- bzw. Ausgänge in der Reaktorabdeckung verbaut.

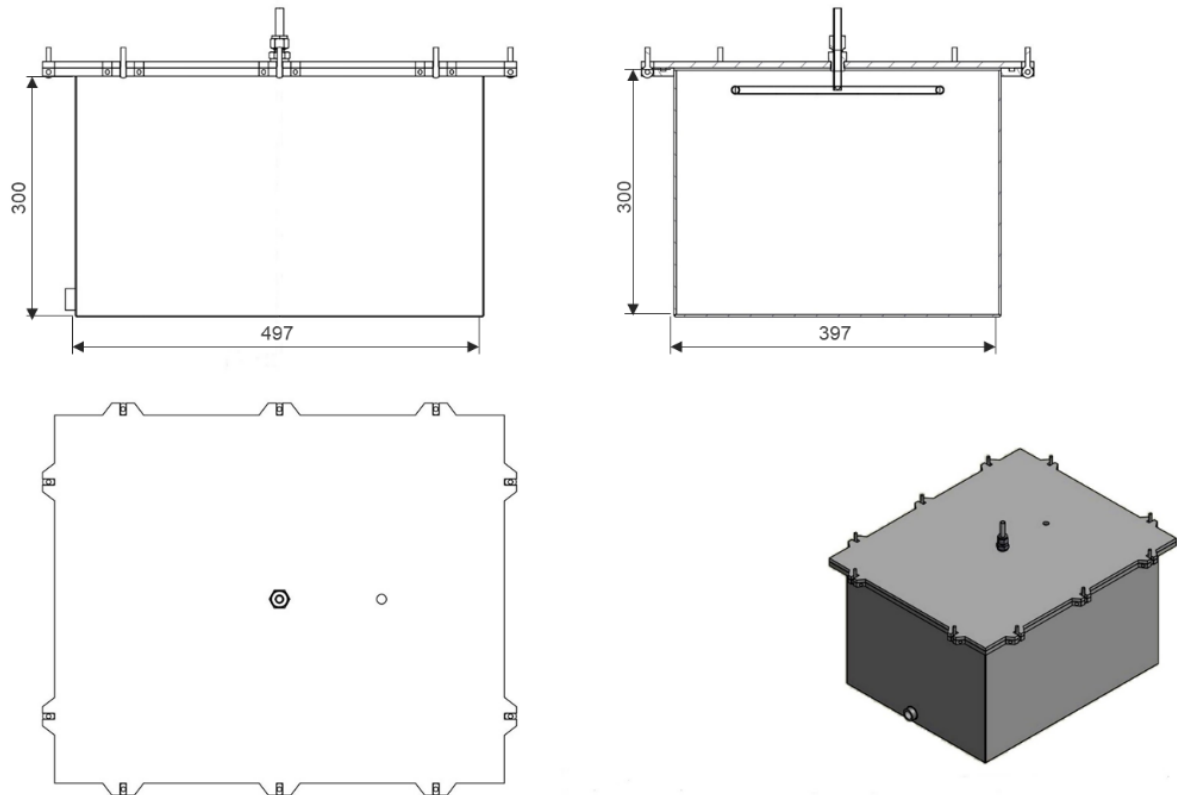


Abbildung 17: Konstruktionszeichnung des Trockenfermenters im Modellmaßstab

Die Perkolation bestand aus einem H-Rohr, das innen hohl und mit Bohrlöchern im Abstand von 50 mm versehen war. Diese ermöglichten es, das entstandene Perkolat mit Hilfe einer Schlauchpumpe gleichmäßig auf das Substrat zu verteilen (Abbildung 18). Der Ausgang diente als Gasauslass, an dem mittels Schlauchaufsatz Gas in Tedlar-Bags gesammelt und analysiert bzw. direkt durch einen mobilen Gasanalysator (Abschnitt 3.6) geleitet werden konnte. Um den Reaktor gasdicht zu verschließen, wurde die Unterseite der Abdeckung und der obere Reaktorrand mit einer Nut versehen, in die eine säurebeständige Ethylen-Propylen-Dien-Monomer-Kautschuk (EPDM)-Dichtung eingelegt wurde.

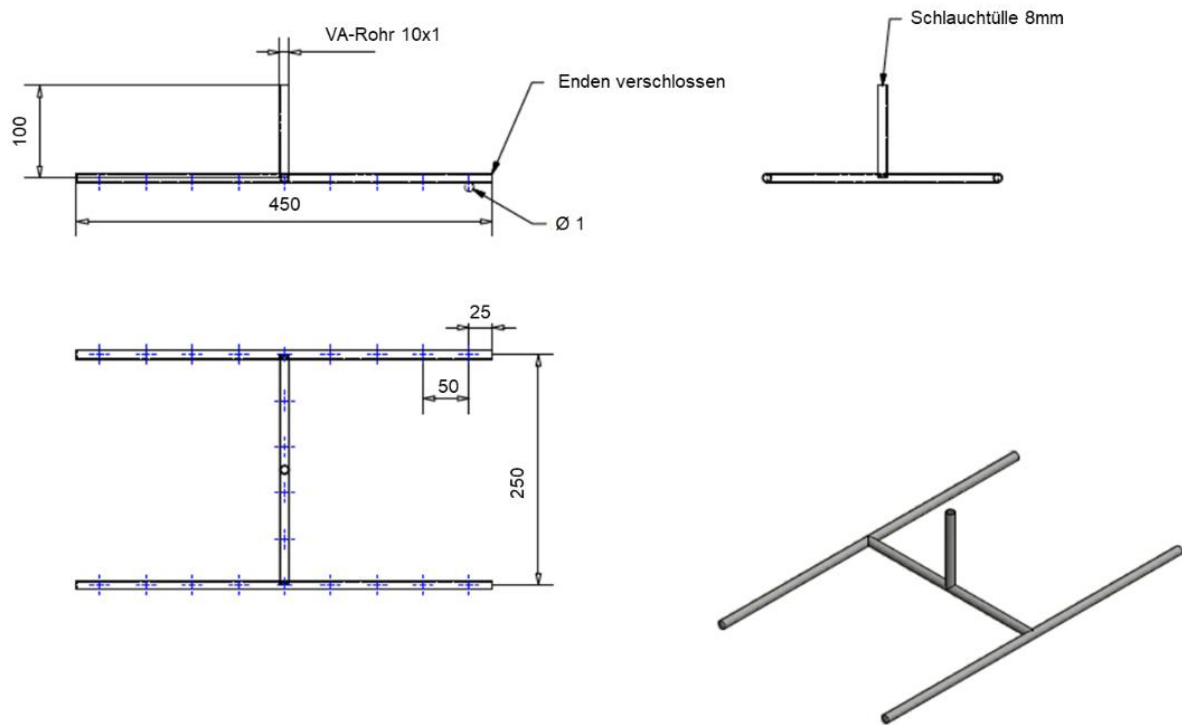


Abbildung 18: Konstruktionszeichnung der Perkolierungsvorrichtung

Reaktorstart: Um den Versuch im Labor unter vergleichbaren Bedingungen nachzustellen, wurde einem Fermenter der Anlage 4 (Tabelle 8), 20 kg bereits fertig gemischten Substrates entnommen und hiervon 17,1 kg in den Fermenter eingefüllt. Dies entsprach einer Füllhöhe von 18 cm. Das Substrat bestand aus Rindergülle, Mais- und Grassilage, sowie einem Anteil an Gärrest (Tabelle 9). Des Weiteren wurden 2 L Perkolat aus der Hauptleitung zur Inokulation des Laborfermenters entnommen. Nach Befüllung wurde der Reaktor verschlossen, inokuliert und für 30 Tage regelmäßig beprobt. Es wurde täglich sämtliches Perkolat aus dem Fermenter entnommen, anschließend 1 L perkoliert und überschussiges Perkolat verworfen. Nach 30-tägiger Vergärung wurde der Reaktor geöffnet, ca. 1/3 des Inhalts entsorgt, 1/3 neues Substrat zugefügt, vermischt und der Reaktor wieder verschlossen. Dieser Vorgang wurde nach weiteren 30 Tagen nochmals durchgeführt.

Tabelle 9: Substrat und Perkolat bei der Trockenfermentation

Befüllung	Substrat entfernt	Substrat hinzu	Perkolat (NM)	Perkolat (Eigen)
1	-	17 kg	3,3 L	-
2	5,5 kg	8 kg	-	1,5 L
3	7,0 kg	9 kg	1,0 L	0,7 L

Probenahme und Analyse: In täglichen Messungen wurde die Gaszusammensetzung (CH₄, CO₂, O₂) mittels Biogasmonitor (BM 5000, Ansyco) bestimmt. Die Bestimmung des Gasvolumens fand über die H₂O-Verdrängung in einem 1000 mL Glasmesszylinder statt. Hierzu wurde das Gas über einen gasdichten Schlauch aus dem Reaktor in den Zylinder geleitet. Die Messung wurde jeweils über zwei bis drei Stunden durchgeführt und anschließend der Volumenstrom h⁻¹ berechnet. Die Temperatur im Reaktor wurde anfangs eingestellt und anschließend anhand der Perkolattemperatur am Auslass überprüft.

3.5.3 Anlagen zur Metall(oid)bestimmung

Gesamtmetall(oid)-Untersuchung: Zur Untersuchung der Metall(oid)belastung wurde ein breites Spektrum an landwirtschaftlichen BGAs und zudem zwei städtische Kläranlagen (KAs) ausgewählt. Es handelte sich hierbei um die BGAs 1-13 sowie die KAs 14 und 15 aus. Bei den untersuchten BGAs handelte es sich mit Ausnahme der Anlagen 4 und 9 um mechanisch durchmischte, kontinuierlich betriebene Nassfermentationssysteme (s. 3.5.1). Anlage 4 ist eine Trockenfermentationsanlage, betrieben nach dem Garagenfermentationsprinzip. Hierzu werden rechteckige Fermenter („Garagen“) mit stapelbarem Substrat befüllt, verschlossen und durch die Perkolation mit Sickerwasser, das während der Fermentation in parallelen Garagen abgeführt wird, berieselt und somit inokuliert. Im Prozess entstandenes Perkolat wird teilweise in den Prozess zurückgeführt, da kurzketige Kohlenstoffe den Prozess fördern. Ein weiterer Teil wird dem Prozess entzogen, weiter vergoren und letztendlich als Flüssigdünger verwendet. In diesem Fall wurde sowohl der Fermenter als auch das Perkolat analysiert. Bei Anlage 9 handelt es sich um einen Eigenbaureaktor, der unterirdisch verlegt war. Der Durchlauf des Substrates wird durch ein Gefälle erreicht und erfolgt ausschließlich durch Gravitation. Es werden keine mechanischen Rühreinheiten zur Durchmischung verwendet.

Probenahme an den technischen Anlagen: Die in den Anlagen beprobten Kompartimente sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für die Gesamtmetall(oid)bestimmung wurden 800 mL als Mischprobe jeweils aus Fermenter und Nachgärer (falls beide vorhanden) entnommen und in 1 L PE-

Flaschen abgefüllt. Aus technischen Gründen (Zugänglichkeit) wurden die Proben in einigen BGAs nur aus den Fermenter entnommen. Wurden an einer Anlage zwei Kompartimente gesondert beprobt, so ist nachfolgend die erste Probe mit a und die zweite mit b bezeichnet, z.B. Probe 1a: Anlage 1, Fermenter, Probe 1b: Anlage 1, Nachgärer.

Alle Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei 4° C im Kühlschrank dunkel gelagert. Zur Bestimmung der redoxsensitiven As-Spezies mussten besondere Vorkehrungen bei der Probenahme getroffen werden, da die reduzierten Spezies in aerober Umgebung sehr instabil sind und leicht oxidiert werden. Die entsprechenden Proben wurden in 300 mL Septumflaschen gefüllt. Diese wurden sofort mit Gummisepten verschlossen und der Kopfraum mit Stickstoff aus einer tragbaren 5 L Flasche gespült. Die Proben wurden danach in eine Glovebox (95 % N₂, 5 % H₂) eingeschleust, um eine Veränderung der Speziesverteilung durch Reaktion mit Luftsauerstoff zu vermeiden.

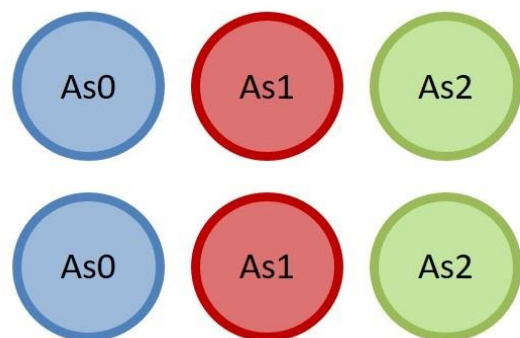
Gasproben wurden als Triplikate mit Hilfe von 10 L Gasbeuteln (Tedlar PLV, Sigma-Aldrich) genommen. Die Gasbeutel wurden am Schlauchstutzen mit einem Viton-Schlauch verbunden und über eine Verjüngung und ein Anschlussstück an den Gashahn des Auslaufs in den Anlagen angeschlossen. In der KA Bayreuth erfolgte die Befüllung der Beutel passiv über den Überdruck im Faulturm. In drei BGAs (1,5,7) wurden die Gasbeutel in einen Vakuumpumpen-Koffer zur Befüllung gelegt.

Für die DNA-Extraktion wurden die Proben, falls vorhanden, aus dem Nachgärer entnommen. Die Proben wurden in 1 L Schottflaschen abgefüllt, sofort abgekühlt, im Labor in 50 mL Drehverschlussgefäße aliquotiert und bei -80° C bis zur Extraktion und Aufreinigung der DNA eingefroren. Ein Teil dieser Proben wurde zur Bestimmung des Trockengewichts (s. Absatz 3.6.2) verwendet.

Satellitenreaktoren: Als wichtige Ergänzung der Untersuchungen an den technischen Anlagen wurden Versuche im Labormaßstab parallel zu den jeweiligen technischen Anlagen durchgeführt, sogenannte Satellitenexperimente. Hierzu wurden 1L Schottflaschen-Reaktoren zur Temperierung (anlagenspezifische Temperatur, um Einflüsse durch den Umgebungswechsel möglichst gering zu halten) in einem Inkubator aufgestellt. Zur Durchmischung wurde eine Magnetrührer-Platte mit externem Steuerelement (TELESYSTEM 06.40, Thermo Scientific) verwendet. Als Amplitude wurden jeweils Rührintervalle von fünf min h⁻¹ bei einer Geschwindigkeit von 185 rpm gewählt. Bei Anlage 1 wurde eine Temperatur

von 48° C eingestellt, bei der KA 42° C. Das Gas wurde durch Schläuche nach außen geleitet und dort in Gasbeuteln gesammelt. (Abbildung 19).

Jeweils in Duplikaten wurde ein unbelasteter (As0, d.h. kein *Zusatz* von weiterem As), ein mittelbelasteter (As1) und ein hochbelasteter (As2) Reaktor betrieben. Im Falle des mittelbelasteten Reaktors wurden 2,4 mL, im Falle des hochbelasteten Reaktors 4,8 mL einer 10 mM NaAsO₂-Lösung zugegeben, um eine Konzentration im Reaktor von 30 bzw. 60 µM zu erhalten. Da zum Zeitpunkt der Zugabe die vorherrschende Konzentration der unbelasteten Substratprobe nicht bekannt war, wurden die jeweiligen Endkonzentrationen unter Annahme einer Null-Belastung berechnet.



As0: Keine Arsenzugabe
As1: Zugabe Arsenit (30 µM)
As2: Zugabe Arsenit (60 µM)

Abbildung 19: Satellitenreaktoren und Versuchsdesign

Reaktorstart: Vor der Entnahme des Gärsubstrates aus den technischen Anlagen wurden die Rohre jeweils mehrere Minuten mit einem Kreislauf-Pumpvorgang gereinigt. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass repräsentatives Material aus dem Fermenter gezogen wurde. Die befüllten Kanister wurden mit Styroporplatten ummantelt, um die Temperaturdifferenz während des Transports so klein wie möglich zu halten. Im Labor wurden die Gärsubstrate in vorgewärmte Schottflaschen gefüllt und mit sauerstofffreiem, temperiertem Wasser verdünnt. Für die Experimente „Jehsen“ wurden jeweils 600 mL Fermenterinhalt mit 200 mL destilliertem Wasser verdünnt, der wässrige Faulturminhalt aus der KA wurde unverdünnt verwendet. Das verwendete Wasser wurde vorher ausgekocht, um den gelösten Sauerstoff auf ein Minimum zu reduzieren. Anschließend wurde die Rührplatte auf ein Intervall von 5 min/h und eine Geschwindigkeit von 100 U/min eingestellt. Nachdem die Reaktoren ca. 24 Stunden im Betrieb waren, wurde das Arsenit zugegeben.



Abbildung 20: Entnahmeverrichtung

Links: Vorrichtung zur Entnahme von Gärsubstrat zur mikrobiologischen Untersuchung, sowie zum Beimengen der Arsenitlösung. *Mitte:* Anschluss zur Entnahme von flüssiger Probe zur Arsenanalytik. *Rechts:* Vorrichtung zur Entnahme von Gas.

Probenahme an den Satellitenreaktoren: Zur Bestimmung der flüchtigen Arsenspezies AsH_3 , $\text{AsH}_2(\text{CH}_3)$, $\text{AsH}(\text{CH}_3)_2$ und $\text{As}(\text{CH}_3)_3$ wurden 1L Tedlar® Beutel verwendet (SKC, Analyt-MTC). Die Beutel wurden mittels Vitonschläuchen an den Reaktor angeschlossen (Abbildung 20). Die Befüllung erfolgte passiv durch den im Reaktor entstehenden Überdruck. Um die lichtempfindlichen Arsenspezies zu schützen, wurden die Beutel während der Probenahme lichtdicht verpackt. Die Gasproben wurden direkt nach der Probenahme analysiert. Zur Bestimmung des CH_4 - und CO_2 -Gehalts bei kleinen Gasvolumina, wurden Gasbeutel (SKG, FlexFoil®) verwendet, die aus vier-schichtiger Folie mit einer Aluminiumschicht in der Mitte bestehen und diese undurchlässig für CO_2 machen. Im Falle einer ausreichenden Gasproduktion wurde bei der

Bestimmung der Gaszusammensetzung auf einen Biogasanalysator (Biogas 5000, Geotech) zurückgegriffen. Da hierzu ein Volumen von mindestens 200 mL benötigt wird, musste in einigen Fällen auf eine GC-Bestimmung zurückgegriffen werden (Kapitel 3.6).

In den Zeiträumen zwischen der Gasprobenahme wurde das Gasvolumen bestimmt. Hierzu wurde das Gas mittels Vier-Wege-Hahn aus Polycarbonat (Neolab) nach einer Stabilisierungsphase zur Drucknormalisierung im System von einer Stunde für einen Zeitraum von zwei Stunden in einen umgedrehten, mit Wasser befüllten Glaszylinder geleitet und anhand der Verdrängung das produzierte Volumen pro Stunde bestimmt.

Die Probenentnahme für die Bestimmung der Arsenspezies aus den Trockenrückständen erfolgte über Rhizon Bodenfeuchteprobennehmer (Rhizon SMS, Eijkelkamp). Hierzu wurde am nach außen gerichteten Ende eine Spritzenkanüle angebracht, an die ein evakuiertes Probengefäß über ein Septum angeschlossen wurde, um über den Unterdruck die Probe anzusaugen.

Neben der Bestimmung in der Flüssigphase sollten die Arsenspezies auch in der Gasphase nachgewiesen werden. Hierzu wurde Biogas in Tedlarbags aufgefangen. Zur Bestimmung

wurde ein Volumen von mindestens 50 mL notwendig. Um einen Zerfall der UV-empfindlichen Spezies zu verhindern, wurden die Bags lichtdicht in Müllbeutel verpackt und bis zur Analyse bei 4° C aufbewahrt.

Da eine Absorption von Arsen an metallische Bauteile nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden flüssige Proben für die molekularbiologische Untersuchung durch einen Vitonschlauch entnommen. Dies war im Lauf Jehsen I und bei der KA möglich, bei Jehsen II und Jehsen III musste die Probenahme aufgrund von starker Schwebstoffbelastung auf vor und nach Beendigung des Experiments beschränkt werden.

Proben für die *DNA-Extraktion* wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20° C gelagert. Ein Teil der entnommenen Probe wurde getrennt abgefüllt und für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (VFAs) in flüssigem Stickstoff eingefroren und ebenfalls bei -20° C gelagert.

3.5.4 Anlagen zur Untersuchung der Mikroplastikbelastung

Zur Untersuchung der Mikroplastikbelastung in BGAs wurden zunächst eine BGA und eine Kompostieranlage zur Vergärung von Bioabfall aus der „braunen Tonne“ (*Anlagen 16 und 17*) sowie eine landwirtschaftliche BGA (Anlage 5; Beschreibung siehe Absatz 3.5.1) zur Gaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen detailliert untersucht. Zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse wurden neun weitere landwirtschaftliche (Anlagen 1-4 und 7- 11; Beschreibung s. 3.5.3) sowie eine bioabfallverwertende BGA (Anlage 18) einem Screening unterzogen. Sämtliche Anlagennummerierungen beziehen sich auf die in Tabelle 8 festgelegte Zuordnung.

Bei Anlage 16 handelte es sich um ein ungerührtes, diskontinuierlich betriebenes Garagenfermentersystem (ähnlich der Anlage in Kapitel 3.5.2). Die Anlage besteht aus sieben separat betriebenen, rechteckigen Fermentern. Die Fermenter besitzen ein Volumen von 945 m³, was einer Füllkapazität von 500 m³ und somit ca. 350 t organischem Material entspricht. Die Fermenter werden vom Boden her beheizt und bei Temperaturen zwischen 40 und 45° C betrieben. Das verwendete Substrat besteht aus einer variablen Mischung aus Bioabfall aus der braunen Tonne (11000 t/a) und Landschaftspflegematerial (3000 t/a). Die Substratzusammensetzung unterliegt saisonalen Schwankungen. In Jahreszeiten mit wenig Bioabfall wird das Substrat bei Bedarf mit Energiepflanzen ergänzt.

Um den Vorgang zu starten, wird das Substrat einige Tage aerob vorverdaut und ein hydrolytischer Voraufschluss erreicht. Anschließend wird ein Teil frisches Substrat mit zwei

Teilen Fermenterinhalt vermennt und mit Hilfe eines Baggers in den Fermenter eingebracht. Der Wassergehalt der Mischung muss unter 15 % liegen, um die Standfestigkeit im Reaktor zu gewährleisten. Anschließend wird der Fermenter verschlossen (um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten) und mit Perkolat, das aus anderen Fermentern aufgefangen wird, berieselt. Nach 28 Tagen wird der Fermenter erneut geöffnet, 30 Vol. -% des Gärrestes entnommen und der Rest mit 30 Vol. -% frischem Substrat erneut fermentiert. Der Gärrest wird anschließend gesiebt (20 mm Maschenweite), um Verunreinigungen wie Steine, größeres Plastik und Metalle zu entfernen, bevor er im weiteren Prozess aerob zu Dünger und Pflanzerde weiterverarbeitet wird. Zur Herstellung von hochqualitativem Dünger reift der Gärrest für 11-13 Monate und wird anschließend bei einer Maschenweite von 10 mm erneut gesiebt. Der Dünger von niedrigerer Qualität reift acht bis neun Monate, die zusätzliche Siebung entfällt.

Anlage 17 ist eine Kompostieranlage, die unter anderem Bioabfälle (Inhalt der Biotonne) verwertet und daraus ebenfalls Dünger für Landwirtschaft und private Abnehmer herstellt. Die Anlage hat eine Kapazität zur Verarbeitung von 8000 t Biomüll und 12000 t Grünschnitt pro Jahr. Es wurden im Zuge der Arbeit zwei Komposterden analysiert, die kommerziell vertrieben werden. Hierbei handelte es sich um zertifizierten Kompost aus zwei unterschiedlichen Siebungen mit 8 mm und 15 mm.

Der Abfall wird zunächst vorsortiert, d.h. nicht organisches Material wie Steine, Kunststoff und Metall werden aussortiert. Anschließend wird mechanisch zerkleinert, gesiebt und auf Rotten kompostiert. Hierbei werden Temperaturen bis zu 70° C erreicht. Danach reift der Kompost für einige Monate und wird nochmals bei einer Maschenweite von 15 bzw. 8 cm gesiebt.

Bei Anlage 18 handelt es sich um eine BGA nach dem Nassvergärungsprinzip zur Verwertung von Bioabfall. Die Anlage hat eine Kapazität von 16000 t a⁻¹, für häusliche Bioabfälle und Bioabfälle aus der Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Jährlich werden 9000 t Dünger produziert, die in flüssiger Form an Landwirte und Privatabnehmer verkauft werden.

Probenahme: Sämtliche Proben, die zur Untersuchung auf Mikroplastik genommen wurden, sind zur besseren Übersicht in Tabelle 10 zusammengefasst. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden für die Probenahmen ausschließlich Glasgefäße verwendet.

Die Proben aus den landwirtschaftlichen Anlagen LaWi-1-5 und 7-11 wurden, falls vorhanden, aus dem Nachgärer entnommen. Hierzu wurde der geöffnete Auslass für kurze Zeit gespült, um die Beprobung von gestautem und somit nichtrepräsentativem Material aus der Rohrleitung zu

vermeiden. Anschließend wurden ca. zwei Liter in Einmachgläser abgefüllt und diese verschlossen.

Bei Anlage 16 (Garagenfermenter) wurden zwei hochqualitative Komposte nach der 10 mm Siebung beprobt. Ein Kompost war elf Monate gereift (*BG-A*), der zweite 13 Monate (*BG-B*). Zudem wurde ein Kompost der minderen Qualität (8 Monate, keine zusätzliche Siebung) (*BG-C*) und das Perkolat (*BG-D*) beprobt. Von jeder Schüttung wurden in einer konstanten Höhe vier Proben von jeweils 0,75 L entnommen und in Einmachgläser gefüllt. Die Proben wurden in gleichen Distanzen genommen: Die erste Probe in einem Abstand von einem Meter von der Wand, die darauffolgenden Proben jeweils einen Meter davon entfernt. Die Proben wurden anschließend vermischt. Zusätzlich wurden, nach vorherigem Spülen der Leitung, 5,5 L Perkolat aus dem System entnommen. Es handelt sich hierbei um die Hauptleitung, in der das Perkolat aus allen parallel betriebenen Fermentern zusammengeführt wird.

Aus der Kompostieranlage (Anlage 17) wurde jeweils von der 8 mm Siebung (*KP8mm*) und der 15 mm Siebung (*KP15mm*) ein 40 L Sack Komposterde auf repräsentative Proben von 3 L reduziert.

Von Anlage 18 wurde eine repräsentative Probe flüssigen Düngers von 1,5 L aus einem kommerziell erhältlichen 5 L-Gebinde entnommen (FD).

Tabelle 10: Probenbezeichnung der Mikroplastikuntersuchung

Anlage 17			Anlage 16				Anlage 18	Anlagen 1-5;7-11
Typ	Kompostierung		Biomüllvergärung				Vergärung	Vergärung
Bez.	KP8mm	KP15mm	BG-A	BG-B	BG-C	BG-D	FD	LaWi

Isolation der MPP: Die Proben wurden zur Isolierung der MPP nassgesiebt. Aufgrund des hohen Feststoffgehalts der Dünger aus Kompostierungsprozessen wurde dieser in Portionen von ca. 300 g in filtrierten Wasser eingeweicht und gesiebt. Für die Siebung wurden stapelbare Edelstahlsiebe mit einem Durchmesser von 200 mm (Analysensieb, Retsch) verwendet. Für die detaillierte Untersuchung der Anlagen *KP8mm*, *KP15mm*, *BG-A – BG-D* sowie *LaWi5* wurden Maschenweiten von fünf, zwei und einem Millimeter verwendet. Im Anschluss an jeden Siebvorgang wurden Objekte, die größer als 5 mm waren, mit gefiltertem Wasser und 30 % Ethanol gespült, um eventuell anhaften Partikel zu lösen. Das Material auf den jeweiligen Siebböden wurde mit Hilfe eines Stereomikroskops (M50, Leica) vorsortiert. Potentielle MPP

wurden bei 40x Vergrößerung mit einer digitalen Mikroskopkamera (DP26, Olympus) fotografiert und vermessen.

Für das Screening der zehn landwirtschaftlichen Anlagen (*LaWi* 1-5 und 7-11) sowie dem kommerziell erhältlichen Flüssigdünger wurden Siebe mit den Maschenweiten 1 mm und 500 µm verwendet.

Fourier-Transform-Infrarot- ATR- Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie): Die Typisierung der MPP erfolgte in einem FT-IR-Spektrometer (Tensor 27, Bruker) mit einem Germaniumkristall für die Messung im ATR(abgeschwächte Totalreflexion)-Modus. Nach der Durchführung von 16 Hintergrundscans wurden jeweils 16 Probenscans durchgeführt, mit einer Auflösung von 8 cm⁻¹ in einer Bandbreite von 3940 bis 800 cm⁻¹.

Die Spektren der potentiellen MPP wurden mit bekannten Absorptionsprofilen der zehn häufigsten Polymertypen verglichen. Wie Löder et al. zeigten, erzeugen unterschiedliche Polymere charakteristische Absorptionsmuster in bestimmten Wellenlängenbereichen ¹³⁰. Zur Bestimmung der Polymerart wurden, wie in Abbildung 21 dargestellt, die Bereiche 1480-1400, 1760-1670 und 2980-2780 cm⁻¹ für Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS), Polyurethan (PU), Polysulfon (PES), Polyethylenterephthalat (PET), Polyamid (PA) und Styrol-Acrylnitril (SAN) sowie die Bereiche 1800-1740 cm⁻¹ für Polycarbonat (PC) betrachtet.

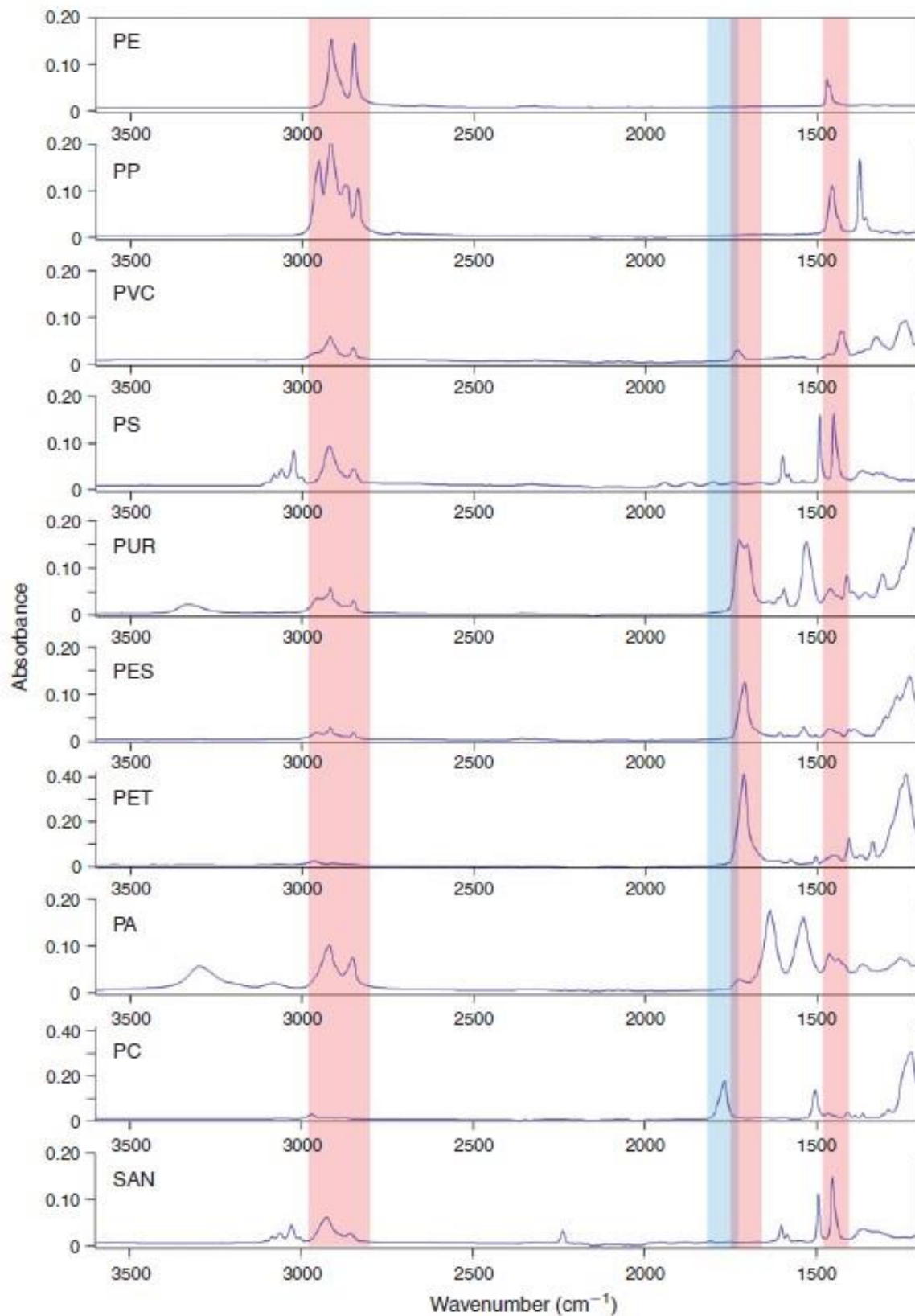


Abbildung 21: IR-Absorptionsspektren häufiger Polymere (entnommen aus Löder et al. ¹³⁰)

Potentielle MPP werden anhand der rot hinterlegten Regionen 1480-1400, 1760-1670 und 2980-2780 cm⁻¹ (PE, PP, PVC, PS, PUR, PES, PET, PA, SAN) und der blau hinterlegten Region von 1800-1740 cm⁻¹ (PC) identifiziert.

3.5.5 Reaktoren zur Untersuchung der Substratflexibilisierung

Die Auswirkungen der Substratflexibilisierung auf die mikrobiologische Entwicklung im Reaktor wurden anhand von Proben, die Langzeitversuchen entstammten, untersucht. Der Reaktorlauf wurde im betriebseigenen Technikum der MicrobEnergy GmbH vom technischen Personal durchgeführt. Der Reaktor wurde hierzu für eine bestimmte Zeit bei konstanten Bedingungen betrieben, bevor eine Intervallfütterung begonnen wurde. Die gesammelten Rückstellproben, die ursprünglich zur Inokulation vorgesehen waren, wurden zur DNA-Extraktion und Analyse an mich übergeben. Diese waren im Verhältnis 1:1 mit Glycerol gemischt und bei -20° C gelagert.

Beim Reaktor handelte es sich um einen Rührkesselreaktor mit 200 L Füllvolumen. Der Reaktor wurde über einen Zeitraum von 1008 Tagen betrieben. Als Substrate kamen Gülle, Getreide, Mais und Kartoffel zum Einsatz. Die Raumbelastung über die Zeit ist in Abbildung 22 abgebildet. Abweichende Substratgabe und unterschiedliche Flexibilisierungsmuster ermöglichen es, die Laufzeit in sechs Phasen zu unterteilen und diese unabhängig voneinander zu betrachten. Dies verbessert zudem die Übersichtlichkeit der mikrobiologischen Versuchsergebnisse. Die jeweiligen Substratzusammensetzungen sind in Tabelle 11 ersichtlich.

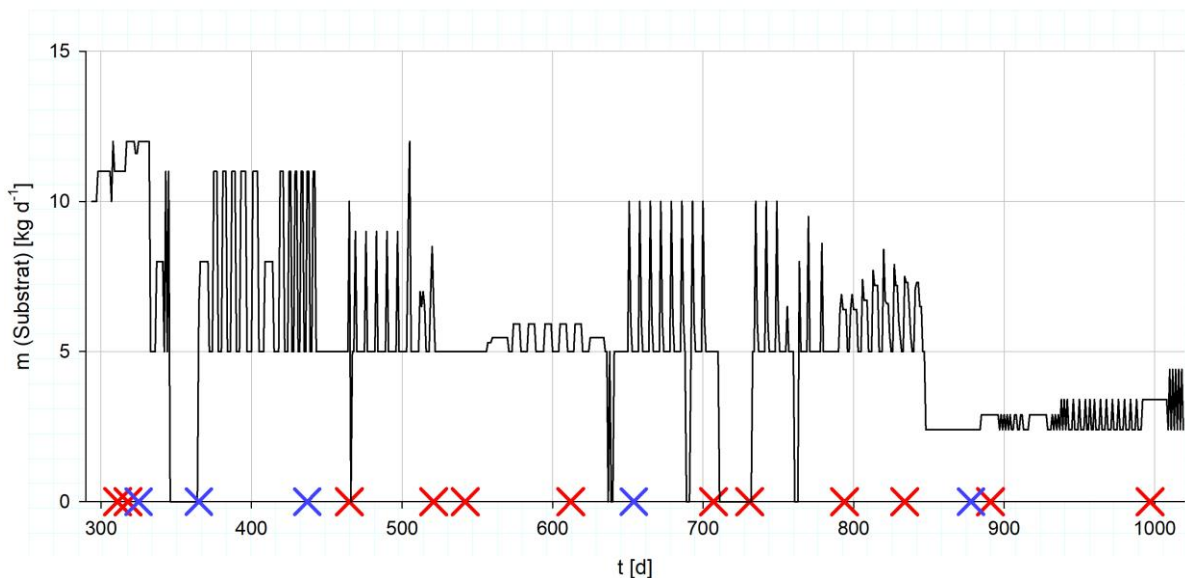


Abbildung 22: Substratzuführung während der Flexibilisierung

Die Kreuze auf der x-Achse markieren die Zeitpunkte, zu denen eine Probe zur DNA-Analytik genommen wurde. Rote Kreuze zeigen Probenahmen, die blauen Kreuze zeigen Probenahmen, an denen zugleich eine Phaseeinteilung stattfindet.

Tabelle 11: Substratzusammensetzung bei der Flexibilisierung

Zeitpunkte	Substrate
332 - 557	Gülle täglich, Getreide in Intervallen
558 - 884	Gülle täglich, Getreide + Mais in Intervallen
885 - Ende	Gülle täglich, Mais und Kartoffeln in Intervallen

3.6 Analyse der Prozessparameter

3.6.1 Leitfähigkeit und pH-Wert

Für die Bestimmung der Leitfähigkeit (Qcond 2400, VWR International) und des pH-Werts (pH10-Pen, VWR International) wurden die Proben durch Vortexen gemischt und anschließend filtriert (Falltenfilter, Wattman).

3.6.2 Trockensubstanz

Umwelttechnische, landwirtschaftliche oder ökologische Proben weisen häufig, bedingt durch äußere Einflüsse, einen schwankenden Wassergehalt auf. Um dennoch vergleichbare Analysen anstellen zu können, wird als Bezugsgröße die Trockensubstanz (TS) herangezogen. So können beispielweise Genkopien aus Biogasanlagen als g⁻¹ TS angegeben werden. Die TS wurde zunächst bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend die Trockensubstanz wie in Formel 8 beschrieben berechnet ¹³¹. Die Trockensubstanz wurde mit Ausnahme der Versuche zur Anlaufphase nach der beschriebenen Vorgehensweise bestimmt.

$$TS (\%) = \left(\frac{m(t)}{m(f)} \right) \times 100 \% \quad (Formel\ 8)$$

TS: Trockensubstanz

m (t): Trockengewicht

m (f): Feuchtgewicht

3.6.3 FOS / TAC

Als Indikator für die Pufferkapazität wurde das Verhältnis flüchtiger organischer Fettsäuren (FOS) zur Carbonat-Pufferkapazität (TAC) durch Titration bestimmt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben zunächst fünf Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und filtriert (Falltenfilter, Wattman) ¹³¹.

3.6.4 Fettsäure-Analytik

Zur Bestimmung der Fettsäure wurden zunächst 500 µL der unbehandelten, wässrigen Probe in ein zwei mL Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen Ameisensäure (3M) versetzt. Das Gefäß wurde unmittelbar verschlossen, der Inhalt gründlich vermischt und für 15 Minuten stehen gelassen. Die angesäuerte Probe erhält einen pH-Wert < 2 und wurde anschließend bei 4° C für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. 250 µL der weitgehend klaren Lösung wurden in Glaseinsätze (Agilent) pipettiert und anschließend in Zweifach-Bestimmung gaschromatografisch (6890N, Agilent) analysiert. Als Säule wurde eine Free Fatty Acid Phase (FFAP)-Kapillarsäule mit den Abmessungen 30m x 320µm x 0,25µm (Optima FFAP, Macherey-Nagel) mit Helium als Trägergas verwendet. Zur Quantifizierung wurde ein externer Standard verwendet. Die Programmeinstellungen sind in Tabelle 12 dargestellt. Auswertung und Datenaufnahme erfolgte mittels Chemstation-Software

Tabelle 12: GC-Einstellungen

	Start bei 85° C für 2 min
Temperaturprogramm	Mit 10° C min ⁻¹ bis 160 °C, 1 min halten Mit 35° C min ⁻¹ bis 200 °C, 3 min halten
He-Fluss	3,0 mL min ⁻¹
Detektortemperatur	280° C

3.6.5 Gasanalytik

Je nach Versuchsbedingungen wurde die Gasanalytik angepasst. Bei der Untersuchung der Anlaufphase wurden Gasvolumen und -zusammensetzung (CH₄, CO₂, H₂, H₂S) über die verbaute Kontrolleinheit (WATCH Biogas Plant Management System, Schmack Biogas GmbH) kontinuierlich aufgezeichnet. Die Parameter wurden separat für Fermenter und Nachgärer aufgezeichnet. Einzige Ausnahme stellt das Gasvolumen dar, das nur als Gesamtvolumen bestimmt wird.

Die Gasanalytik an den Laborreaktoren wurde an die anfallenden Gasvolumenströme angepasst. Der Biogasanalysator (Biogas 5000, Geotech) benötigt ein Gasvolumen von mindestens 500 mL, daher war dieser nicht für alle Laborexperimente geeignet. Am Garagenfermenter (s. Kapitel 3.5.2) wurde die Gaszusammensetzung mit Hilfe des

Biogasanalysators bestimmt. Dieser ist mit einem IR-Sensor für die CH₄/CO₂-Messung und einem elektrochemischen Sensor zur O₂-Bestimmung ausgestattet.

Im Falle von kleineren Gasvolumen wurde die CH₄-Konzentration mittels Gaschromatographie (Agilent 6890N) gemessen. Die Proben wurden hierzu mit einer 1mL Gasspritze (SGE) durch das Septum am Gassack entnommen und die Spritze damit zweimal gespült. Anschließend wurden erneut 1mL der Gasprobe entnommen und hiervon 0,2 mL zügig injiziert. Die verwendete Säule war eine gepackte Kohlenstoffsäule (ShinCarbon ST column micropacked, Restek) mit einem Innendurchmesser von 1 mm und 2 m Säulenlänge. Als mobile Phase wurde Helium verwendet, die Quantifizierung erfolgte über einen TCD-Detektor (Agilent), die Auswertung und Datenaufnahme erfolgte mittels Chemstation-Software (Tabelle 6). Die Laufparameter sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: GC-Parameter bei der CH₄-Bestimmung.

Temperaturprogramm	Start 40° C für 3 min, Mit 8° C min ⁻¹ auf 115° C, 2 min halten
He-Fluss	20 mL/min
Detektortemperatur	200° C

3.6.6 Weitere Parameter

Im Falle der Untersuchung der Anlaufphase von Anlage 5 (Tabelle 8) wurden zusätzliche Parameter von einem externen Analyselabor ermittelt (Schmack Biogas GmbH, Schwandorf). Die Parameter sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Physiko-chemische Parameter

Parameter	Norm
VFA (nur Anlaufphase)	DIN 38409 H21
Spurenelemente (Ba, Pb, B, Cr, Co, Fe, Cu, Mn, Mo, Na, Ni, Se, V, Zn, W)	DIN ISO 11885
Nährstoffe (NH ₄ -N)	DIN ISO 11885
Organische Trockensubstanz	DIN EN 12879

3.7 DNA-Extraktion

Für molekularbiologische Analysen ist insbesondere die Qualität der isolierten DNA wichtig. Besonders bei der Extraktion von Nukleinsäure aus Umweltproben kann es durch eine Vielzahl von Stoffen zu Störungen kommen. Um DNA aus verschiedenartigen Proben zu extrahieren, sind am Markt zahlreiche Kits zur schnellen und einfachen Extraktion von Nukleinsäuren verfügbar. Zur Validierung der Anwendbarkeit wurden einige dieser Kits und eine Phenolextraktionsmethode getestet. Die Vorgehensweise ist im Folgenden beschrieben.

3.7.1 Kommerzielle Kits

Um die bestmögliche DNA-Qualität zu erreichen wurden verschiedene Extraktions-Kits getestet. Es werden auf dem Markt keine speziellen Kits für Proben aus Biogasanlagen angeboten. Die Hersteller empfehlen daher auf Kits für Umweltproben auszuweichen. Getestet wurden drei Kits zur DNA-Extraktion, sowie ein Kit zur nachgeschalteten Aufreinigung bereits extrahierter DNA (Tabelle 15).

Tabelle 15: Kits zur DNA-Extraktion

Hersteller	Bezeichnung	Anwendung
OMEGA	E.Z.N.A.® Soil DNA Kit	DNA-Extraktion
MO BIO	PowerSoil®DNA Isolation Kit	DNA-Extraktion
MP Biomedicals	FastDNA™ SPIN Kit for Soil	DNA-Extraktion
Machery-Nagel	NucleoSpin® gDNA Clean-up	DNA-Aufreinigung

Für die DNA-Extraktion wurden jeweils Proben aus BGAs (Anlagen 7 und 8) verwendet und die DNA, wie in der Anleitung beschrieben, extrahiert. Es handelte sich bei allen Versuchen um Kits zum mechanischen Zellaufschluss. Hierzu wurden die Proben im Homogenisator (FastPrep24, MP Biomedicals) bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/sec aufgeschlossen.

Die nachgeschaltete DNA-Extraktion wurde mit Extrakten aus Anlage 5 durchgeführt. Die Extrakte wurden mit nuklease-freiem Wasser (UltraPure™ DNase / RNase-Free Distilled Water, Thermo Scientific) im Verhältnis 1:3 verdünnt, um in dem Konzentrationsbereich zu liegen, der in der Anleitung angegeben ist (< 25 µg). Anschließend wurde die Aufreinigung nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Güte der Extraktion wurde über die Absorptionsverhältnisse spektrometrisch (Nanodrop 2000, Thermo Fisher) kontrolliert.

3.7.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Als sehr zuverlässige Methode bei Bakterien mit robuster Zellwand wurde der mechanische Zellaufschluss mittels Homogenisieren angewendet, bei dem die Zellen mit Hilfe von Keramikugeln zerschlagen werden. Hierzu wurde ein phenolhaltiges Lösungsmittelgemisch und ein CTAB-Extraktionspuffer zugegeben. Dieser enthält neben einem pH-Puffer β -Mercaptoethanol, das Ribonukleasen und Desoxyribonukleasen, die bei der Zelllyse freigesetzt werden, inaktiviert (Töwe et al. 2011). Unlösliche Humine werden durch die Phasentrennung abgetrennt, da diese nicht in die wässrige Phase übergehen. Huminsäuren und Fulvinsäuren werden in die Phenolphase aufgenommen und können somit während des Extraktionsprozesses größtenteils entfernt werden (Friedrich; Wang et al. 2012).

Bei einer anschließenden Zentrifugation erhält man drei Phasen. In der wässrigen, oberen Phase sind die Nukleinsäuren enthalten. In der mittleren Interphase reichern sich denaturierte Proteine an, während in der unteren Phase, die hauptsächlich aus Phenol und Chloroform besteht, kaum Proteine enthalten sind (Liu 2009). Die wässrige Phase wurde entnommen und mit Chloroform extrahiert, um das restliche Phenol zu entfernen. Zur Verhinderung von Schaumbildung wurde dem Chloroform Isoamylalkohol beigemischt. Im Anschluss fand ein Fällungsschritt statt. Nach Zugabe einer Polyethylenglycol (PEG)- und NaCl-haltigen Lösung wurde auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG kann der Huminstoffgehalt in der Lösung deutlich reduziert werden. Vergleichsproben zeigen, dass der Huminstoffgehalt ohne die PEG-Fällung bis zu viermal höher ist. Der DNA-Gehalt wird durch die Fällung nicht beeinflusst (Töwe et al. 2011; Zhang and Fang 2006).

Die letztendlich vorliegende DNA in Form eines Pellets wurde durch Waschen mit Ethanol von Salzen befreit, die möglicherweise im vorherigen Schritt mit den Nukleinsäuren ausgefällt wurden (Stevenson 1994).

Durchführung: Für die Extraktion wurden Proben aus der BGA, die auf -80°C gelagert wurden, aufgetaut, gevortext und jeweils Volumen von $\sim 1,5\text{ mL}$ in 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 16 ersichtlich. Anschließend wurden ca. $0,3\text{ g}$ der Probe in 2 mL Tubes mit Keramikbeads mit einem Durchmesser von $0,6 - 0,8\text{ mm}$ (NucleoSpin® Bead Tubes Type A, Macherey-Nagel) eingewogen, mit jeweils $0,5\text{ mL}$ Lösung A und $0,5\text{ mL}$ Lösung B versetzt und für 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von $6,5\text{ m s}^{-1}$ im Homogenisator (FastPrep24, MP Biomedicals) aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe bei $13.000 \times g$ für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend in einem Reaktionsgefäß mit demselben Volumen an Lösung C versetzt,

geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt zur Chloroformentfernung wurde wiederholt. Die wässrige Phase wurde mit demselben Volumen an Lösung D versetzt, für zwei Stunden auf Eis inkubiert und für 10 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, erneut zwei Minuten zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer Pipette abgezogen. Nun wurde das entstandene Pellet mit Lösung E (ca. -20° C) gewaschen, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 150 µL DEPC-Wasser gelöst. Der Nukleinsäure-Gehalt wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm spektrometrisch bestimmt (Nanodrop 2000, Thermo Fisher) und die Extrakte zur DNA-Analyse bis zur Weiterverwendung bei -20° C, über kurze Zeiträume bei 4°C gelagert.

Tabelle 16: Verwendete Lösungen zur DNA-Extraktion

Bezeichnung	Chemikalien	Konzentration
Lösung A ₁	CTAB	0,27 M
	NaCl	0,70 M
	DEPC	0,1 % (v/v)
Lösung A ₂	K ₂ HPO ₄	0,94 M
	KH ₂ PO ₄	0,06 M
	DEPC	0,1 % (v/v)
Lösung A	Lösung A ₁ : Lösung A ₂	1:1
Lösung B	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol	25:24:1
Lösung C	Chloroform : Isoamylalkohol	24:1
Lösung D	PEG 8000	10 % (v/v)
	NaCl	1,2 M
	DEPC	0,1 % (v/v)
Lösung E	Ethanol	70 %
Lösung F	DEPC : MilliQ-Wasser	1:1000

3.7.3 Versuchsspezifische Abweichungen in der Extraktionsmethode

Aufgrund von Abweichungen in der Probenbeschaffenheit wurden verschiedene Schritte der DNA-Extraktion modifiziert, um eine ausreichende Qualität für die Analytik zu gewährleisten. Komplexe Fragestellungen machten es notwendig, viele Anlagen mit verschiedenen Verfahrensweisen und Substratzusammensetzungen zu untersuchen. Typische Fälle, in der eine Anpassung der Methode erforderlich war, sind beispielsweise dunkle Verfärbungen des DNA-

Pellets, die auf Huminstoffe hinweisen und milchiger Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt, der auf starke Proteinbelastung hinweist. Als wichtigster Indikator für die DNA-Qualität wurden die Absorptionsspektren im Nanodrop 260/280 und 230/260 herangezogen.

Zur Evaluierung verschiedener Modifikationen in der Methode wurden in der Vorbereitungsphase mehrere Ansätze getestet und so die individuell beste Lösung ermittelt. Im Folgenden sind projektbezogene Modifikationen aufgeführt.

Extraktion Anlaufphase: Abweichend vom Standardprotokoll wurde zur Probenhomogenisierung für 210 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (3200 rpm) gevortext (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Hierzu wurden die Proben horizontal mit Klebeband auf dem Vortexer befestigt. Diese Extraktionsmethode wird vom Hersteller der Beadtubes (Macherey-Nagel) empfohlen und verursacht keine Einschränkungen in der Qualität der extrahierten DNA.

Extraktion Arsenprojekt: Im Arsenprojekt wurde DNA aus 15 BGAs und KAs im Produktionsmaßstab sowie für weitere Ansätze, die in den Labormaßstab übertragen wurden, extrahiert. Es sollte für alle Anlagen dieselbe Methode verwendet werden, um die Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse zu gewährleisten. Es konnten gute Ergebnisse erzielt werden indem: 1) die Einwaage von 0,5 g auf 0,15 g verringert wurde, um die Störstoffbelastung zu reduzieren und ein „Überladen“ zu vermeiden. 2) Der erste Zentrifugationsschritt wurde von fünf auf zehn Minuten verlängert. Hierdurch wird die Phase besser von schlecht wasserlöslichen Verbindungen getrennt (ohne Verminderung des DNA-Gehalts). 3) Das Pellet wurde in 60 µL reinem Wasser gelöst, um mögliche Inhibitoren möglichst stark zu verdünnen.

Extraktion Substratflexibilisierung: Die Proben waren im Verhältnis 1:1 v/v mit Glycerin versetzt. Zur Vorbereitung der Proben wurden 0,5 mL der Proben für zwei Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µL zweifach destilliertem Wasser resuspendiert und anschließend in ein Beadtube überführt. Die an die Extraktion anschließende Zentrifugation wurde abweichend von Standardprotokoll von fünf auf zehn Minuten verlängert.

3.8 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Quantifizierung der bakteriellen- und methanogenen Archaeen-Gemeinschaft wurden spezifische Abschnitte der 16S-rRNA-Gene beziehungsweise des Methyl-Coenzym-M-

Reduktase (*mcrA*)-Gens herangezogen. Dieses kodiert für die α -Untereinheit Methyl-Coenzym-M-Reduktase, die den letzten Schritt der Methanisierung katalysiert. Durch die direkte Beteiligung an der Methanbildung werden ausschließlich die fünf Ordnungen der methanogene Archaeen detektiert, während sonstige Archaeengruppen vernachlässigt werden^{60,61}. Zunächst wurde ein Inhibitionstest durchgeführt, da es besonders bei der Verwendung von Nukleinsäuren, die aus Umweltproben extrahiert wurden, zu Komplikationen bei der PCR kommen kann. Dies ist der Fall, da Inhibitoren wie Huminstoffe oder Phenolsäuren, die Enzymreaktionen stören können^{132,133}. Hierzu wurde eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Zudem wurde in Testläufen versucht, die Qualität der qPCR durch die Zugabe von Bovinem Serum Albumin (BSA)¹³⁴ und Dimethylsulfoxid (DMSO)¹³⁵ in verschiedenen Konzentrationen zu optimieren. *Durchführung:* Für die Quantifizierung wurde die DNA-Konzentration der Extrakte mittels UV-VIS-Spektrometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) bestimmt und diese im Anschluss auf die Konzentration von 5 ng DNA Ansatz⁻¹ (4,3 μ L) verdünnt. Zusammen mit dem jeweiligen Ansatz, (Tabelle 17 und Tabelle 18) wurden die Proben in 96-Wellplatten (low profile, Thermo Scientific) pipettiert und mit den Ansätzen, bestehend aus SybrGreen Mastermix (KAPA[™] SYBR FAST QPCR MasterMix Universal, Kapa), Referenz Dye (ROX Low, Kappa) sowie den jeweiligen Primern versetzt. Für die Quantifizierung von *mcrA* wurde mit den Primern *mlas* und *mcrA*-rev⁶¹ gearbeitet, für die Quantifizierung der 16S-rRNA-Genkopien mit den Primern BAC338F und BAC805R¹²⁸. Die Primersequenzen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Anschließend wurden die Platten verschlossen (Ultra Clear Cap Strips, Thermo Scientific), für fünf Minuten bei 500 x g in der Plattenzentrifuge (Multifuge 3 S-R, Thermo Fisher) zentrifugiert und anschließend die Genkopienzahl im qPCR Gerät (Mx3005P, Agilent) bestimmt. Die Temperaturzyklen sind in Tabelle 19 ersichtlich.

Von den verwendeten Plasmidstandards wurden jeweils Verdünnungsreihen, die 10⁹ bis 10⁵ Genkopien enthielten, hergestellt. Die Standardgerade wurde aus Mittelwerten einer Dreifachbestimmung erstellt.

Zur weiteren Qualitätssicherung wurde die Fragmentgröße der PCR-Produkte im Anschluss an die Messung durch eine Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden die Ansätze aus den Wells auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 17: qPCR-Ansätze zur Quantifizierung der mcrA-Gensequenzen

Komponente	Volumen / Reaktion [μ L]
mlas (250nM)	0,25
<i>mcrA</i> -rev (250nM]	0,25
Kapa Sybr Green	5,0
ROX-Low	0,2
DNA-Extrakt	4,3
Volumen / Reaktion	10

Tabelle 18: qPCR-Ansätze zur Quantifizierung der 16S-rRNA-Gensequenzen

Komponente	Volumen / Reaktion [μ L]
BAC338F (250nM)	0,25
BAC805R (250nM]	0,25
Kapa Sybr Green	5,0
ROX-Low	0,2
DNA-Extrakt	4,3
Volumen / Reaktion	10

Tabelle 19: Temperaturzyklen bei der Genquantifizierung

Anzahl Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	95	180
	95	30
40	62	45
	72	30
	95	15
1	55	30
	95	10

3.8.1 Herstellung von Plasmidstandards zur Quantifizierung

Plasmidstandards mit bekannter Kopienzahl zur Quantifizierung wurden durch Klonieren und Ligieren der entsprechenden Sequenz hergestellt (*mcrA*, 16S-rRNA-Gensequenzen), die aus methanogenen Archaeen bzw. Reinkulturen von Clostridien stammten. Es wurde ein kommerzielles Klonierungskit verwendet (CloneJet PCR Cloning Kit, Thermo Scientific). Der Ausstrich von acht transformierten Klonen erfolgte auf Carbenicillin-Selektionsmedium. Anschließend wurden 24 Klone gepickt, aufgeschlossen und mittels PCR auf Vorhandensein der gewünschten Sequenzen getestet. Anschließend wurden vier Klone ausgewählt, diese in 200 mL Schüttelkolben vermehrt und Plasmide isoliert. Die Korrektheit des Inserts wurde anschließend durch Sequenzierung bestätigt (Microsynth AG, Schweiz).

Im Falle des 16S-rRNA-Standards ergab sich eine Konzentration von $7,34 \times 10^{10}$ Molekülen μL^{-1} , und für den *mcrA*-Standard eine Konzentration von $1,18 \times 10^{11}$ Molekülen μL^{-1} .

3.8.2 Rückrechnung der Quantifizierung

Um die Ergebnisse in der Einheit [Kopien g^{-1} Trockensubstanz] darzustellen, wurden die in Formel 9 dargestellten Berechnungen angestellt.

$$\text{Genkopien [Kopien g}^{-1}\text{TS]} = \left(\frac{(\text{Genkopien [Kopien } \mu\text{L}^{-1}] \times V_F)}{m (\text{Einwaage}) [\mu\text{g}]} \right) \times 1000 \quad (\text{Formel 9})$$

V_F : Verdünnungsfaktor

3.9 Automatisierte Ribosomale intergenische Spacer Analyse (ARISA)

Ein Fingerprint der mikrobiellen Gemeinschaft wurde erstellt, um ein Bild von der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft in den BGAs zu bestimmten Zeitpunkten zu erhalten. Hierzu wurde die ARISA, die automatisierte Anwendung der RISA verwendet, bei der die Auftrennung der vervielfältigten Banden mittels Kapillarelektrophorese statt auf einem Gel durchgeführt wird. Dies ermöglicht eine höhere Sensitivität und einen höheren Probendurchsatz.

Das Prinzip der ARISA basiert auf hochkonservierten Regionen der 16S- und 23S-rRNA-Gene, die durch variable ITS-Regionen unterbrochen sind (Abbildung 23). Die ITS-Regionen, die für Transfer-Ribonukleinsäure (tRNA) codieren können, eignen sich aufgrund ihrer Heterogenität in Länge und Sequenz zur Unterscheidung zwischen Bakterienstämmen und engverwandten Arten. Die ITS-Region kann je nach Organismus eine Länge von 50 Basenpaaren (bp) bis zu über 1500 bp annehmen^{43,136}. Bei der ARISA wird ein fluoreszenzmarkierter Vorwärtsprimer sowie ein Rückwärtsprimer an die 16S- und die 23S- rRNA-Gene angelagert, um die dazwischenliegende ITS-Region mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zu amplifizieren. Die entstehenden Fragmente von unterschiedlicher Länge können anschließend denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Da ein Laserdetektor die Signale aufnimmt, kann ein hoher Durchsatz erreicht werden. Jedes Fragment entspricht nun mindestens einem Organismus in der ursprünglichen Gemeinschaft¹³⁷.

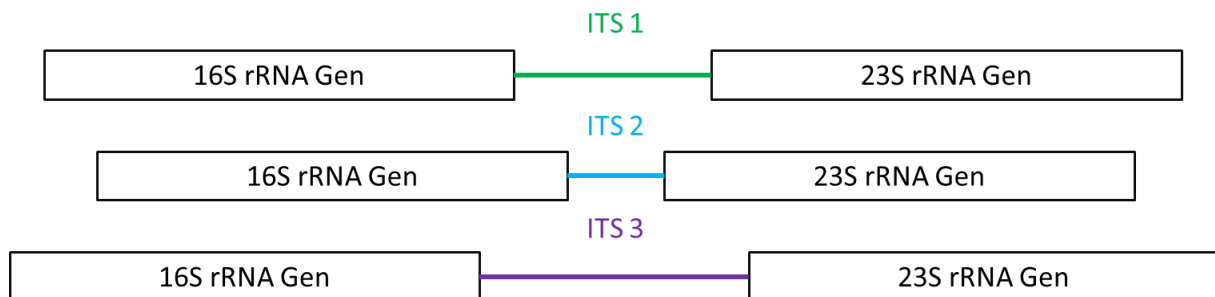


Abbildung 23: Schematische Darstellung der ITS-Region

Bei der ARISA binden die Primer links und rechts an hochkonservierten Regionen der 16 bzw. 23 rRNA-Gene. Die ITS-Regionen 1-3 stehen symbolisch für die variablen Regionen unterschiedlicher Prokaryoten. Die unterschiedlich langen ITS-Region zwischen den Primerbindungsstellen werden mittels PCR vervielfältigt und anschließend aufgetrennt.

Durchführung: Die ARISA wurde, wie in Weithmann et al.¹³⁸ detailliert beschrieben, nach einer von Weig et al.⁴⁴ modifizierten Variante des Protokolls von Fisher und Triplett¹³⁶ mit 10 ng DNA in 12,5 µL PCR-Volumen durchgeführt. Zur Amplifizierung der Regionen der Archaeen-Gemeinschaft wurden die Primer 16S-RIS-M und 23S-RIS-M⁴⁷ und für die bakterielle ITS-Region die Primer ITSF und ITSReub¹²⁹ verwendet. Die jeweiligen

Vorwärtsprimer wurden dabei mit den Fluoreszenzmarkern BMF-6 (ITSF) und BMN-5 (16S-RIS-M) für eine Detektion in der nachfolgenden Parallel-Kapillarelektrophorese markiert.

Um das Risiko einer Diskriminierung von Fragmenten durch die Probenahme und Extraktion zu minimieren, wurde die DNA aus jeder Probe dreifach extrahiert und daraus ein äquimolares Gemisch hergestellt.

3.10 Next-Generation Sequenzierung (NGS)

Im Anschluss an die ARISA wurden ausgewählte Proben mittels Amplikonsequenzierung (MiSeq, Illumina) unter Verwendung des MiSeq V3 Kits (Illumina) untersucht, um detaillierte Informationen über die Zusammensetzung der mikrobiellen Population zu erhalten.

Durchführung: Das Vorgehen bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung ist in Weithmann et al.¹³⁸ im Detail beschrieben. Die 16S-rRNA-Gen-Amplifizierung und -Sequenzierung wurde von der LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die verwendeten Primer waren eine modifizierte Version des 341F-Vorwärts- und eine ebenfalls modifizierte Version des U806R-Rückwärtsprimers^{128,139}. Diese sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Sequenzdaten wurden zum NCBI Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) unter der Zugangsnummer PRJNA328116 hinzugefügt.

3.11 Gesamtmetall(oid)-Konzentrationen und Arsenspezies aus den Rückständen

3.11.1 Bestimmung der Gesamtmetall(oid)-Konzentrationen

Es wurden 0,5 g der homogenen Probe in Mikrowellengefäße eingewogen und anschließend mit 4 mL H₂O₂ (30 % (v/v)) sowie 3 mL HNO₃ (65 % (v/v)) versetzt und mittels Mikrowellendruckaufschluss (CEM, MARS Xpress) aufgeschlossen (Programm: 10 min bis auf 220° C heizen, 45 min Temperatur halten, 20 min abkühlen, 1600 W). Die Extrakte wurden anschließend gefiltert. Allen Proben wurden Rh und Re als interner Standard (IS) zugegeben (pro Probe 5 µg/L).

Zur Qualifizierung und Quantifizierung der vorhandenen Metall(oid)e in den technischen Anlagen wurde ein semi-quantitativer Scan durchgeführt. Zur exakten Bestimmung der Elementkonzentrationen von Cr, Co, Ni, Se, Rb, Sr, As, Mo, Cd, Sb, Ba, Pb, Bi, U, Mn, Cu, Zn, Al und Fe wurde ein weiterer voll-quantitativer Scan durchgeführt. Beide Bestimmungen wurden mit einem induktiv-gekoppelten-Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS, Thermo Scientific, X-Series2) durchgeführt. Um die Qualität der Bestimmung und den Einfluss von

Matrixeffekten zu überprüfen, wurden alle Proben für jedes Element mit drei verschiedenen Konzentrationen versetzt und im Anschluss die Abweichung der Konzentrationen berechnet.

3.11.2 Bestimmung der As-Spezies

Um den Abbau der Arsenspezies nach der Probennahme zu verhindern, mussten die Proben zunächst durch Ansäuern stabilisiert werden. Vorherige Versuche zeigten, dass die besten Resultate durch das Ansäuern mit 10µL HCl (6M) erzielt werden. Das Eisen wird in Lösung gehalten und ein Konvertieren der Arsenspezies verhindert. Da in den Proben keine Sulfide vorhanden waren, musste keine Zugabe von Wasserstoffperoxid erfolgen. Die Proben mussten mittels Mikrowellenaufschluss aufgeschlossen werden, weil ein hoher organischer Anteil vorhanden war. Hierzu wurden 0,5 g der Proben in Teflongefäße eingewogen und bei 200° C für zwei Stunden aufgeschlossen. Proben, die aus technischen Anlagen genommen wurden, mussten zusätzlich noch durch einen Cellulosefilter mit 0,45µm Porengröße filtriert werden. Bei den Laborexperimenten war dies aufgrund der Probenentnahme durch die Rhizonsampler nicht notwendig.

Die unmethylierten As-Spezies (As(III) und As(V)) sowie die methylierten As-Spezies (MMA(V) und DMA(V)) wurden mittels Ionen-Austausch-Chromatographie gekoppelt mit einem induktiv-gekoppelten-Plasma-Massenspektrometer (IC-ICP-MS) gemessen. Aufgrund großer Matrixeffekte wurden ausgewählte Proben mit bekannten Konzentrationen aller As-Spezies gespiked.

Die Metall(oid)-bestimmungen in der Flüssigphase wurden von Herrn Dr. Samer Bachmaf vom Lehrstuhl für Umweltgeochemie durchgeführt.

3.12 Arsenspezifizierung aus der Gasphase

Arsin und Methylarsin-Verbindungen können simultan bestimmt werden. Hierzu wurde ein automatisiertes CT-CF-GC-AFS/EI-MS-Systems verwendet, das auf dem Saturn 2000 Ionenfallen GC-EI-MS von Varian basiert. Eine schematische Darstellung der verwendeten Apparatur ist in Abbildung 24 gezeigt.

Die Anlage besteht aus zwei zentralen Einheiten. Um die in der Gasphase in sehr geringer Konzentration vorliegende Arsenspezies bestimmen zu können, mussten diese zunächst aufkonzentriert werden. Dies wurde mittels *Cryotrapping* und anschließendes *Cryofocssing* erreicht. Das *Cryotrapping* wurde in einer Kryofalle (CT) durchgeführt. Die CT besteht aus einer inerten Kieselsäureschicht, die von einer Edelstahlsäule mit sulfonierter Oberfläche umgeben ist. Diese wird in flüssigem Argon auf -186° C gekühlt. Hinter die CT ist die

Untereinheit für die Kryofokussierung (CF) geschaltet. Diese besteht aus einer Quarzglaskapillare, die zum Schutz ebenfalls in eine Edelstahlsäule gefasst ist und mittels flüssigem Stickstoff (N_2) auf $-198^\circ C$ gekühlt wird.

Die zweite wichtige Einheit der Apparatur ist ein, der Säule nachgeschaltetes, Y-Ventil, das sich im GC-Ofen befindet und den Gasstrom des Analyseases aufteilt, sodass ein Teil zum Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie (EI-MS), der andere zum Atomfluoreszenzspektrometer (AFS) geführt wird.

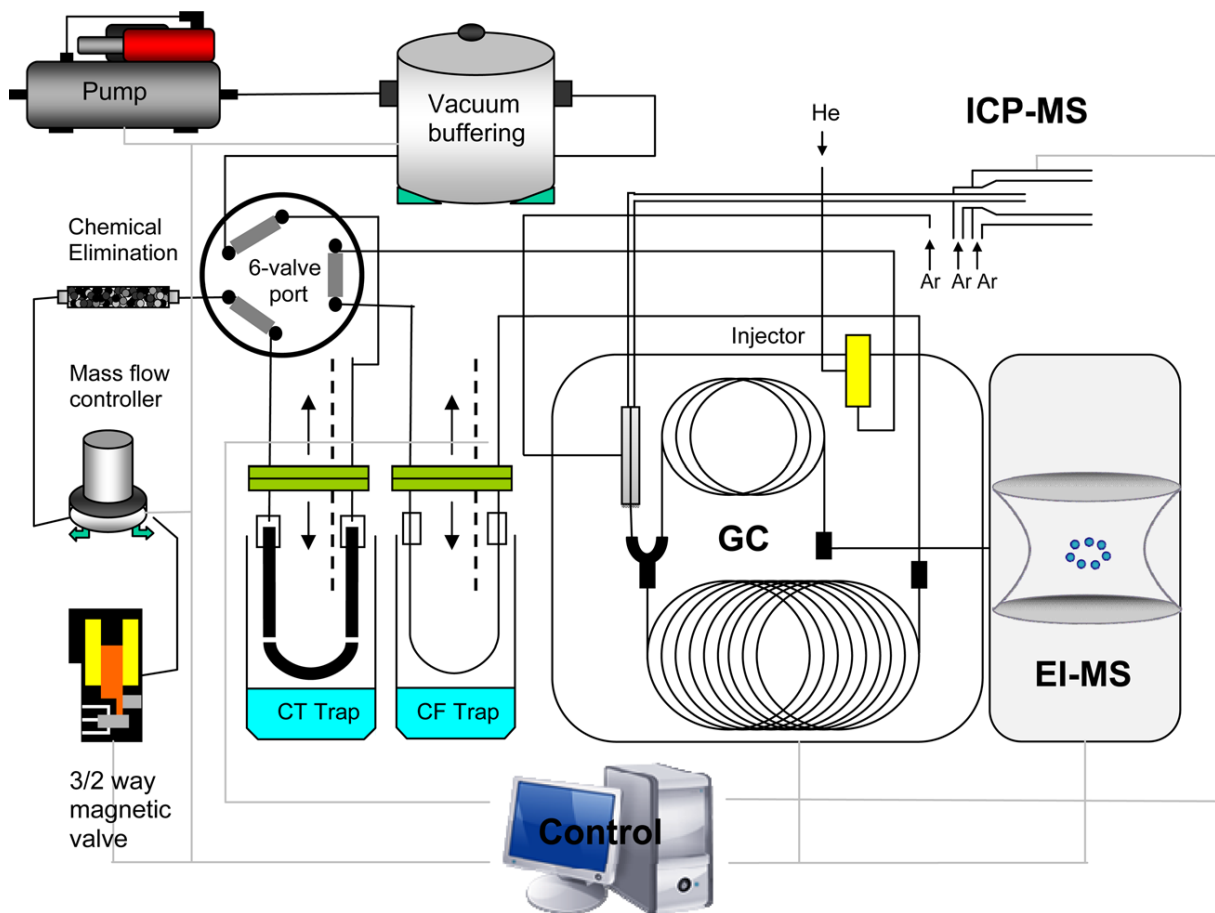


Abbildung 24: Apparatur zur Analyse volatiler As-Verbindungen (CT-CF-GC-ICP-MS/EI-MS-Kopplung) (entnommen aus Ilgen et al. ¹⁴⁰)

Probenvorbereitung: Die Proben aus den Hauptkomponenten CH_4 und CO_2 wurden zunächst in den Tedlarbags im Verhältnis 1:10 mit N_2 verdünnt. Die verwendeten Spritzen wurden mit N_2 vorgespült, um einen Eintrag von Sauerstoff und den damit verbundenen Abbau empfindlicher Arsenspezies zu vermeiden.

Herstellen der Standards: Die externen Standards Arsin (AsH_3), Monomethylarsin ($MeAsH_2$), Dimethylarsin (Me_2AsH) und Trimethylarsin (Me_3As) wurden vor der Analyse durch Hydrierung von wässriger Arsenitlösung (Merck), Monomethylarsonsäure (MMA) ($\geq 97\%$,

Argus Chemicals), Dimethylarsensäure (DMA) ($\geq 97\%$, Merck) und Trimethylarsenoxid (TMAO) ($\geq 97\%$, Argus Chemicals) mit Natriumborhydrid ($\geq 99\%$, Fluka) in 1M Phosphorsäurelösung hergestellt. Eine detaillierte Beschreibung hierzu findet sich in ^{140 140}. Die Standards wurden in einer Konzentration von 2 ng L^{-1} Arsen verwendet. Die Mischung wurde in einer, der Biogasproben ähnlichen, 1:10 mit N_2 verdünnten Matrix aus CH_4 und CO_2 (60% / 40%) angesetzt.

Durchführung der Messung: Für die Kalibrierung wurden $0,1\text{ pg As}$ auf die Säule gegeben. Dies entspricht bei der verwendeten Standardkonzentration einem Volumen von 50 mL . Die Kalibrierung erfolgte durch Messung von Triplikaten.

Für die Probenanalyse wurden Gasbags (Tedlar), die die unbehandelte Gasprobe enthielten, mit N_2 auf ein Gesamtvolumen von 1 L aufgefüllt und an das Einlassventil der CT-CF-Einheit angeschlossen. Um störendes CO_2 und H_2O aus den Gasproben chemisch zu binden und abzutrennen, wurden die Proben zunächst durch eine NaOH -Falle geleitet. Alle Proben wurden zweifach gemessen. Im Anschluss an die Probenmessungen wurde ein weiterer Standard gemessen, um einen Drift des Gerätes während der Messungen auszuschließen.

Die Bestimmung der As-Spezies aus den Anlagen im Produktionsmaßstab wurden von Frau Julia Arndt durchgeführt. Die Bestimmung der As-Spezies aus den Laborreaktoren wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Erik Hüllen und Herrn Dr. Ilgen durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Promotionsarbeit zusammengefasst und diskutiert.

4.1 DNA-Extraktion

Als Basis für Untersuchungen der mikrobiellen Vorgänge in Biogasanlagen dienen Nukleinsäuren, die aus den Reaktorproben isoliert werden. Da eine Vielzahl der Analysenmethoden PCR-basiert sind, werden in der Probenvorbereitung beispielsweise Enzyminhibitoren aus den Proben entfernt, da diese zur Hemmung der Polymerase führen und somit erheblich Einfluss auf die Ergebnisse haben können ¹⁴¹. Die hohen Anforderungen an die Extraktionsmethode resultierten aus der Vielzahl von Anlagen mit unterschiedlicher Substratbeschaffenheit und die damit verbundenen Variationen der Probenparameter und Störstoffbelastungen. Ziel war es eine Methode zu etablieren, die eine möglichst hohe Reinheit für alle Proben innerhalb eines Versuchssetups ermöglicht.

Für die Extraktion der DNA wurden kommerziell erhältliche Kits zur Extraktion aus Umweltproben, sowie eine Variante der Phenol-Chloroform-Extraktion getestet. Zudem wurden eine nachgeschaltete Säulenaufreinigung und der Zusatz von Additiven evaluiert.

4.1.1 Kommerzielle Kits und Phenol-Chloroform-Extraktion

Tabelle 20 zeigt die Absorptionsverhältnisse und Konzentrationen der gDNA aus verschiedenen Extraktionsmethoden. Für den Versuch wurden Proben aus den BGAs 7 und 8 ausgewählt, die in vorherigen Versuchen bereits einen hohen Störstoffgehalt aufwiesen. Die Bezeichnungen MP, MOBIO und Omega stehen für Kits zur gDNA-Aufreinigung verschiedener Hersteller, die in Kapitel 3.7.1 erläutert sind. Die Phenol-Chloroform Methode ist in Kapitel 3.7.2 erläutert. Die Ergebnisse zeigen, dass das MOBIO-Kit sowohl die niedrigsten Absorptionsverhältnisse als auch einen sehr geringen Gehalt an DNA liefert. Reine DNA erreicht ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 Optische Dichte ((OD) 260 =1) entspricht der Konzentration von 50 ng / μ L. Typische Verunreinigungen der DNA-Extrakte wie EDTA und Ethanol absorbieren bei 230 nm, Phenol bei 270 nm^{142,143} und Huminsäuren erreichen ihr Absorptionsmaximum zwischen 270 und 280 nm¹⁴⁴. Proteine können ihr Maximum bei 220 nm erreichen, wo die Peptidbindungen absorbieren oder bei 280 nm wo das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren liegt^{142,145}. Als Indikator für die Qualität von DNA-Extrakten kann also das Absorptionsverhältnis der Wellenlängen 260 / 230 nm und 260 / 280 nm herangezogen werden. Man geht bei reiner Nukleinsäure von einem Verhältnis 260 / 280 von 1,8 aus.

Das Omega-Kit schnitt unter den kommerziellen Kits am besten ab und erreichte im Verhältnis 260 / 280 nm Werte zwischen 1,71 und 1,81. Die Kit-Extraktionen zeigen im Vergleich zur Phenol-Chloroform-Extraktion deutlich niedrigere Absorptionsverhältnisse der Wellenlängen 260 / 230 nm, was auf eine unzureichende Abtrennung von Störstoffen hinweist. Zudem zeigten die Extrakte aus den MP-Proben einen Braunstich, möglicherweise aufgrund starker Verunreinigungen mit Huminstoffen.

Tabelle 20: Absorptionsverhältnisse verschiedener DNA-Extrakte

Methode	Anlage	260/280	260/230	c (gDNA) [ng μL^{-1}]
MP	7	1,46	0,23	95,2
MP	8	1,53	0,33	185,4
MOBIO	7	0,97	0,36	11
MOBIO	8	0,95	0,35	12,6
Omega	7	1,71	0,33	62,1
Omega	8	1,81	0,10	51,5
Phenol / Chloroform	7	1,85	1,46	124,5
Phenol / Chloroform	8	1,98	1,60	116,9

Der berechnete DNA-Gehalt ist bei der Extraktion mit dem MP-Kit am höchsten. Anhand der DNA-Konzentration kann an dieser Stelle jedoch keine Aussage über die tatsächliche Ausbeute der prokaryotischen DNA getroffen werden. Alle aufgeführten Methoden sind für den mechanischen Zellaufschluss optimiert, und werden mit unterschiedlichen *Beads* durchgeführt, die maßgeblich die Kräfte beeinflussen, die auf das Probenmaterial wirken. Da die spektrometrische Messung keine Aussage über die Herkunft oder Art der isolierten DNA treffen kann, ist es möglich, dass hohe DNA-Konzentrationen von einem hohen Anteil an pflanzlicher DNA herrühren. Als wichtiges Beurteilungskriterium wurde die Absorptionskurve bei der Messung herangezogen. Abbildung 25 zeigt die Absorption im relevanten Spektrum. Es zeigt sich, dass ausschließlich mit der Phenol-Chloroform-Extraktion ein Absorptionsmaximum in Bereich von 260 nm erreicht wurde.

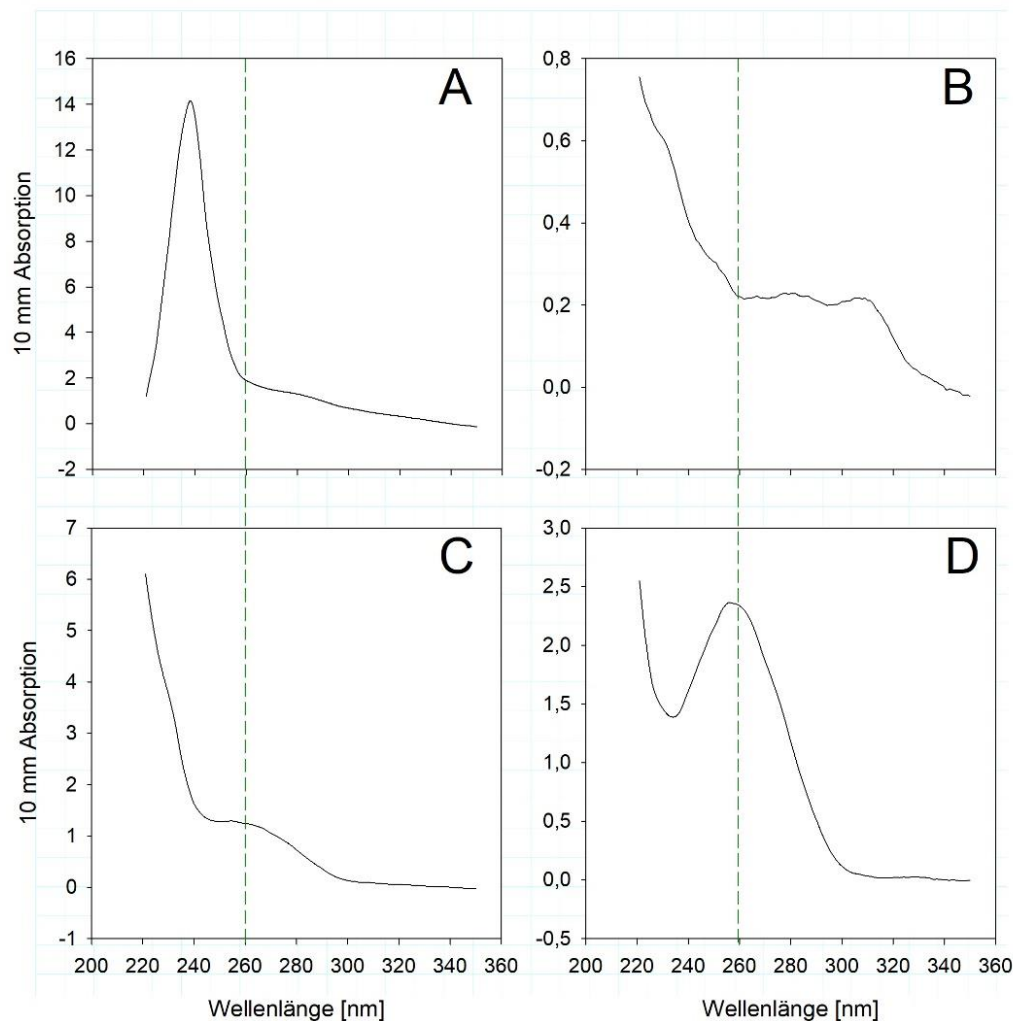


Abbildung 25: Absorptionsspektren der DNA-Extrakte

Die Absorptionsspektren der Extrakte aus A) MP B) MOBIO C) Omega und D) Phenol-Chloroform. Die grüne Linie markiert die Wellenlänge von 260 nm, bei der das Absorptionsmaximum von DNA liegt.

Neben dem mechanischen Zellaufschluss existieren weitere Methoden des Zellaufschlusses, wie das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließendes Zerreiben, oder Aufschlusstechniken mit Ultraschall ^{4,42}. Es wurde der mechanische Zellaufschluss angewendet, da Methoden der chemischen Zelllyse sowie der Lyse mittels Ultraschall, die von Frau Dr. Naumann im Vorfeld getestet wurden, zu keinen ausreichenden Ergebnissen führten ^{146,147}. Wie Yeates et al. bei der Extraktion von DNA aus Bodenproben zeigen, führt der mechanische Zellaufschluss zu einer hohen Ausbeute an DNA und zu hohen Reinheitsgraden ¹⁴⁸. Andere Studien zeigen jedoch auch, dass es durch dieses Verfahren zu einem Aufschluss von Pflanzenmaterial kommt ¹⁴¹. Zellwände von Mais beinhalten einen hohen Gehalt an neutralen und sauren Polysacchariden, die bekannte Polymerasehemmer sind ^{141,149}. Wie zahlreiche Tests während der Vorbereitungsphase zeigten, können diese Stoffe

durch versuchsspezifische Modifikationen der Methode im weiteren Verlauf abgetrennt werden. In Tabelle A 1 im Anhang sind die Ergebnisse der spektrometrischen Absorptionsmessung der DNA-Extrakte aus 15 verschiedenen Anlagen aufgezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der modifizierten Phenol-Chloroform- Extraktion in allen Anlagen gute Reinheiten erzielt werden können. Zudem wurden alle Kurven analysiert und die Proben mittels PCR und Gelelektrophorese auf Amplifizierbarkeit geprüft.

4.1.2 Säulenaufreinigung

Mit der nachgeschalteten Säulenaufreinigung (Tabelle 21) konnte jeweils eine deutliche Verbesserung der Absorptionsverhältnisse, sowohl bei 260/230 als auch bei 260/280, erreicht werden. Diese geht allerdings mit einem deutlichen Verlust der gemessenen Nukleinsäuren einher. Der Verlust beträgt 23 bzw. 31 % der gesamten Nukleinsäuren. Aufgrund der deutlichen Verluste an DNA-Gehalt war die Probe für die nachfolgenden Analysenschritte nicht geeignet, da Verluste während der Extraktion zu Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung und zur Diskriminierung weniger stark abundanter Organismengruppen bei der Populationsanalyse führen können.

Tabelle 21: Nachgeschaltete Säulenaufreinigung

Es sind die Absorptionsverhältnisse, DNA-Gehalt und Verlust, jeweils vor und nach Säulenaufreinigung angegeben.

	260/280	260/230	m (DNA) [ng]	Verlust [%]
Probe 1 vor	1,78	1,27	6105	23
Probe 1 nach	1,87	1,66	4730	
Probe 2 vor	1,78	1,32	6960	31
Probe 2 nach	1,89	1,74	4815	

4.1.3 Zugabe von Additiven

Während es in den meisten Fällen möglich war, die Qualität der DNA durch Modifikationen der Phenol-Chloroform-Extraktion ausreichen aufzureinigen, war dies in Einzelfällen nicht möglich. Ein Beispiel stellt Anlage 12 dar, die durch Trockenfermentation hauptsächlich Bioabfälle aus der braunen Tonnen vergärt.

Die PCR wurde durch die Zugabe von BSA zu den DNA-Extrakten ermöglicht. Das BSA wurde direkt zum PCR-Ansatz gegeben. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, konnte keine PCR-Amplifikation in Reihe 2 (ohne BSA) stattfinden, während in Reihe 3 (mit BSA) eine deutliche Bande zu sehen ist. Wie in der Literatur gezeigt wird, unterdrückt das BSA die Wirkung

verschiedener Inhibitoren, bindet Lipide und Anionen und fungiert als alternatives Substrat für Proteasen. Somit wird die Polymerase vor Abbau oder Inaktivierung geschützt ^{132,150}. Weitere Versuchsreihen zeigten auch, dass in qPCR-Anwendungen keine Nachteile durch die Zugabe von BSA entstehen.

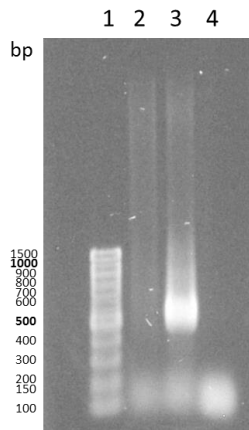


Abbildung 26: PCR mit und ohne Zugabe von BSA

1: 1kb Leiter; 2: Probe ohne BSA 3: Probe mit BSA 4: Blindprobe mit BSA

4.2 Untersuchungen der mikrobiellen Population

Zur Untersuchung der Vorgänge sowie der Auswirkungen auf die mikrobielle Population, beispielsweise beim Vergleich verschiedener Anlagen oder bei Änderungen bestimmter Parameter, wurden in der Arbeit hauptsächlich zwei molekularbiologische Methoden verwendet. Zunächst wurde eine *ARISA* durchgeführt, die als kostengünstige Methode die Analyse einer hohen Probenanzahl ermöglicht und somit die ideale Basis für eine statistische Auswertung schafft. Anschließend wurden, sofern notwendig, einzelne Organismen bis auf die Gattungsebene durch *NGS-Sequenzierungen* bestimmt. Im Folgenden sind Daten von 13 BGAs und zwei KAs dargestellt, die einen Überblick über Anwendungsmöglichkeiten der verwendeten Methoden geben sollen.

Die Hauptkoordinaten-Analyse der bakteriellen *ARISA*-Fragmente der verschiedenen Anlagen sind in Abbildung 27 dargestellt. Es wurden hierzu jeweils drei separat extrahierte DNA-Proben aus den jeweiligen Anlagen analysiert. Es ist zu erkennen, dass die Fragmentmuster aus den Proben derselben Anlagen jeweils nahe beieinanderliegen. Die BGAs bilden zudem zwei Cluster, einer auf halber Höhe der y-Achse im linken Bereich der x-Achse links, ein weiterer im oberen Bereich der y-Achse im rechten Bereich der x-Achse. Die Anlage 4 befindet sich in der Mitte der beiden Cluster. Zudem ist zu erkennen, dass sich die beiden KAs getrennt von den BGAs im unteren Bereich des Koordinatensystems befinden.

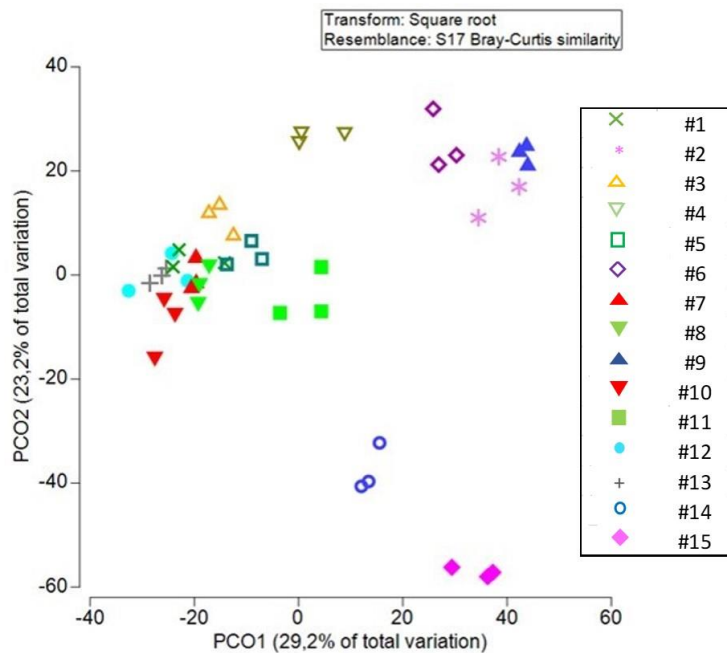


Abbildung 27: Hauptkoordinatenanalyse der ARISA-Fragmente aus 15 Anlagen.

Es sind jeweils die Ergebnisse der Analysen aus drei separaten DNS-Extrakten mit demselben Symbol gekennzeichnet dargestellt. Die Nummerierung bezieht sich auf die Anlagenbezeichnungen (1-15) aus

Die Nähe der jeweiligen Replikate zueinander im Koordinatensystem, die durch übereinstimmende Fragmentverteilung in diesen Proben entsteht, zeigt die Verlässlichkeit der Methode. Dies wird zudem durch die separierte Anordnung der beiden KAs, in welchen aufgrund der abweichenden Substratbeschaffenheit und Verfahrensweise eine differenzierte mikrobielle Gemeinschaft erwartet wurde, verdeutlicht. Zudem können auch weniger offensichtliche Abweichungen in der Verfahrensweise und deren Auswirkungen auf die mikrobielle Gemeinschaft detektiert werden. So werden die drei Anlagen, die einen Cluster im oberen rechten Quadranten der Darstellung bilden, als einstufige Anlagen ohne Nachgärer betrieben. Zwischen den Clustern liegt noch relativ isoliert Anlage 4, (siehe Tabelle 8), die als einzige der untersuchten Anlagen nach dem Garagenfermentprinzip betrieben wird. Purahong et al. untersuchten die Verlässlichkeit mehrerer ARISA-Primerpaare, unter anderem die hier verwendeten Bakterien-Primer ITSf und ITSr_{eb} ¹⁵¹. Es wurde beschrieben, dass einige *in silicio* amplifizierte Sequenzen keine Mikroorganismen repräsentieren, sondern aus Chloroplasten stammen, unter anderen aus *Sorghum*-, *Oryza*-, *Brassica*- und verschiedener *Zea*-Spezies. Eine Überprüfung der zugehörigen Chloroplasten-ITS-Regionen auf NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) ergab, dass hierzu mindestens eine Nichtübereinstimmung von einem bp notwendig ist. Zudem wäre die Länge der amplifizierten Regionen im Bereich von 2,4 kb und damit deutlich länger als alle Regionen, die in den

vorliegenden Studien amplifiziert wurden. Diese besaßen Fragmentlängen < 1kb. Die meisten der von Purahong et al. als Referenz aufgeführten Chloroplastensequenzen wurden zwischenzeitlich aufgrund offensichtlicher Kontamination des Pflanzenmaterials mit Mikroorganismen wieder von der NCBI-Datenbank entfernt ¹⁵¹.

Aus oben genannten Gründen eignet sich die ARISA vor allem zur Analyse von Mustern und zeit- oder faktorabhängigen Trends in den mikrobiellen Gemeinschaften. Um die Populationen genauer beschreiben zu können, wurden ausgewählte Proben im Anschluss nach dem Prinzip des *Next Generations Sequencing (NGS)* sequenziert. Details zur Sequenzanalyse sind in Tabelle A 2 und Tabelle A 3 im Anhang zusammengefasst. Die relative Abundanz der Organismen in den jeweiligen Reaktoren sind in Abbildung 28 dargestellt. Um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen, sind die Organismen auf der taxonomischen Ebene der „Klasse“ dargestellt. Außerdem wurden für die grafische Darstellung nur Klassen miteinbezogen, die über 1 % der jeweiligen Gesamtpopulation eines Reaktors repräsentieren.

Während Anzahl, Varianz und Mengenverteilung der Organismen zwischen den BGAs schwankten, waren die dominierenden Klassen größtenteils identisch Abbildung 28. Die größte Klasse machte *Clostridia* aus, gefolgt von *Bacteroidia*. Eine Ausnahme zeigt die Faulturmprobe der Anlage 3. Hier war die dominierende Klasse *Actinobacteria*. *Methanomicrobia* ist die einzige *Archaeenklasse*, die in einigen Anlagen eine relative Abundanz > 1 % der Gesamtpopulation erreicht. Es konnten insgesamt fünf verschiedene Klassen der Archaeen nachgewiesen werden. In den meisten Anlagen dominierte die Klasse der *Methanomicrobia*. Eine Ausnahme stellt Anlage 10 dar. Hier stellt die Klasse der *Methanobacteria* mit 82 % der Gesamtpopulation die größte Fraktion.

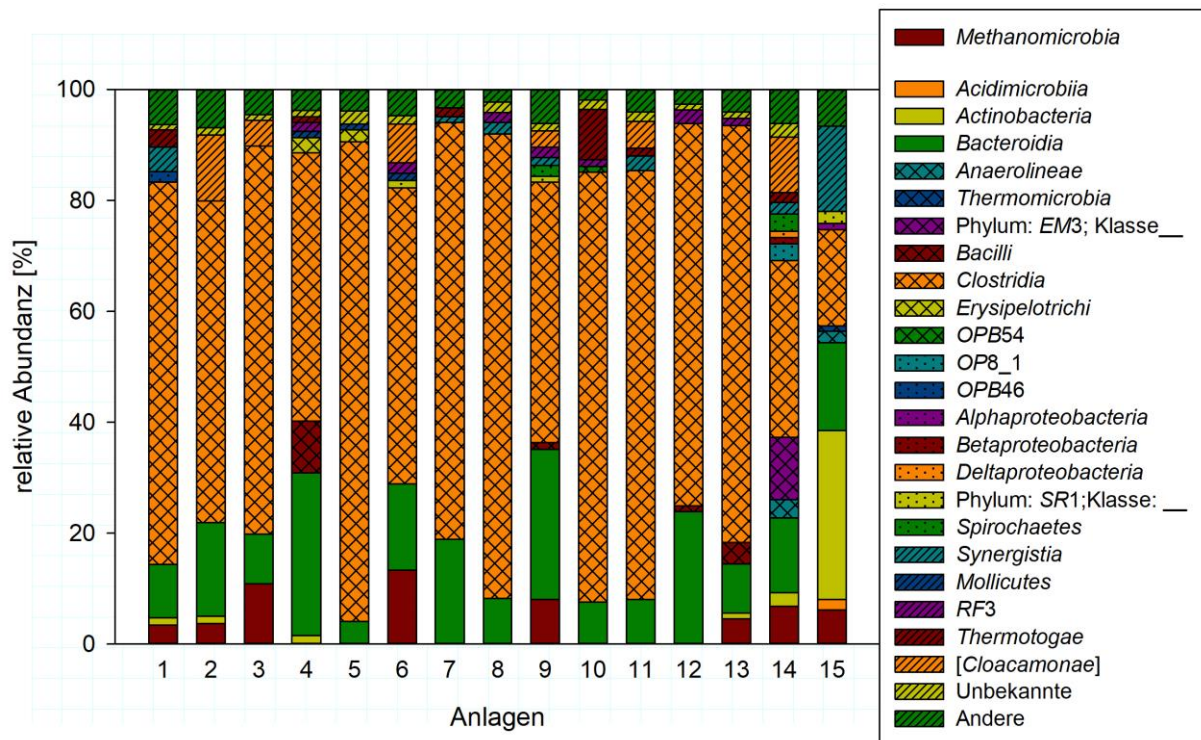


Abbildung 28: NGS der Gesamtpopulation aus verschiedenen Anlagen

y-Achse: Klassen, die weniger als 1% der Gesamtpopulation repräsentieren, sind als „Andere“ zusammengefasst.
 Kann die Sequenz keiner bekannten Klasse zugeordnet werden, sind diese unter „Unbekannte“ zusammengefasst.
 x-Achse: Die verschiedenen Anlagen sind entsprechend Tabelle 8 nummeriert.

4.3 Anlaufphase einer technischen Biogasanlage

Der Etablierungsprozess zweier getrennter Anlagenkomponenten einer landwirtschaftlichen BGA, Fermenter und Nachgärer, wurden für eine Zeitspanne von 240 Tagen, beginnend direkt nach der Inokulation, durch Analyse der Prozessparameter sowie anhand der Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft untersucht. Inhalte dieses Kapitels sind in Weithmann et al. veröffentlicht ¹³⁸.

4.3.1 Laufparameter der technischen Anlage

Die kontinuierlich erfassten Parameter Biogasproduktionsrate [m^3d^{-1}], CH_4 - und H_2 -Gehalt, sind in Abbildung 29 dargestellt. Abbildung 30 zeigt die diskontinuierlichen Prozessparameter pH-Wert, Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$) [mg g^{-1} oTS] und FOS/TAC-Wert. Die flüchtigen Fettsäuren (VFA) [mg kg^{-1} oTS] zeigt Abbildung 31. Mit Ausnahme der Biogasproduktionsrate, die begründet durch eine fehlende separate Erfassungseinrichtung für Fermenter und Nachgärer nicht einzeln aufgenommen werden konnte, wurden alle Parameter für beide Anlagenkomponenten getrennt erfasst.

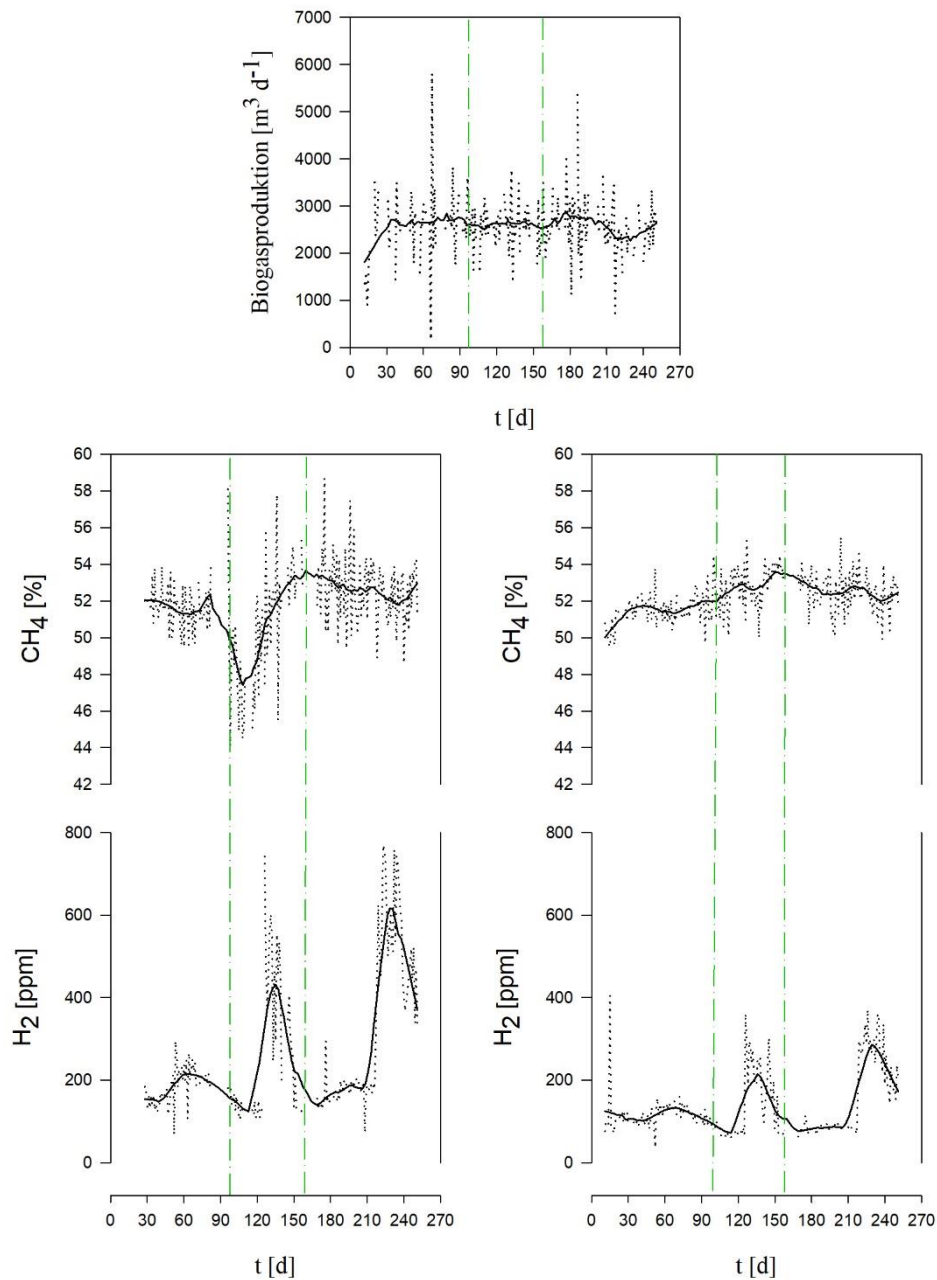


Abbildung 29: Biogasproduktion, CH₄- und H₂-Gehalt ¹³⁸

Aufgrund der häufigen Messwerterfassung wurde jeweils eine interpolierte Linie (schwarz) zur Verdeutlichung des Trends eingefügt. Die schwarzen Punkte zeigen die genauen Messwerte. **Oben:** Biogasgesamtproduktion für beide Kompartimente **Mitte:** Methangehalt des Gases in %. **Links** im Fermenter und **rechts** im Nachgärer. **Unten:** H₂-Konzentration in ppm. **Rechts** im Fermenter und **links** im Nachgärer. Die grünen, punktierten Linien markieren Wechsel in der Substratzusammensetzung. *Erste Linie:* zusätzliche Gabe von Grassilage (nach ca. 100 Tagen). Ab der *zweiten Linie*, ca. 160 Tage nach Start, wurde zudem Körnerschrot hinzugegeben.

Die Gasproduktion stabilisierte sich mit Erreichen der Endtemperatur in Fermenter und Nachgärer innerhalb der ersten 30 Tage. In den ersten 100 Tagen des Prozesses enthielt das Gas in beiden Kompartimenten einen durchschnittlichen CH_4 -Gehalt zwischen 50 und 52 %, die H_2 Konzentration lag unter 300 ppm im Fermenter und unter 200 ppm im Nachgärer. Anschließend begann für ca. 70 Tage eine Phase mit deutlichen Schwankungen im CH_4 -Gehalt, bevor sich dieser wieder auf etwas höherem Niveau einpendelte. Die Schwankungen gehen mit der Erweiterung des Substrats, das bis Tag 100 ausschließlich aus Maissilage bestand, durch die zusätzliche Gabe von Grassilage, einher. Ebenso nimmt in Folge der Substraterweiterung die Konzentration an Essigsäure deutlich zu (Abbildung 31). An Tag 59 beträgt die Konzentration im Fermenter 192 mg kg^{-1} , steigt dann zunächst auf 1804 mg kg^{-1} an Tag 101 und erreicht den höchsten Wert von 2367 mg kg^{-1} an Tag 121, was einem Anstieg um den Faktor zwölf darstellt. Einhergehend mit dem Anstieg der Essigsäure steigt der FOS/TAC-Wert, der das Verhältnis der organischen Säuren zur Pufferkapazität darstellt. Der pH-Wert bleibt konstant, bedingt durch die Carbonat-Pufferkapazität und das alkalische Ammoniak. Der $\text{NH}_4\text{-N}$ hat zu diesem Zeitpunkt bereits einen Wert von ca. $1,8 \text{ g kg}^{-1}$ organische Trockensubstanz (oTS) erreicht. Das Verbleiben im neutralen Bereich ist wichtig für die methanogenen Archaeen und somit für den gesamten CH_4 -Bildungsprozess¹⁹. Nach ca. 120 Tagen steigt die H_2 -Konzentration, die sich im normalen Betrieb zwischen 100 und 200 ppm bewegt, stellenweise bis um das Vierfache an. Des Weiteren kann an Tag 120 im Fermenter ein Anstieg der Propionsäurekonzentration auf 139 mg kg^{-1} OS sowie der iso-Valeriansäurekonzentration auf 104 mg kg^{-1} oTS beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Vorgänge ist, dass Essigsäure und H_2 als Produkte mikrobieller Abbauvorgänge anfallen. Beide dienen in der Folge als Bausteine für die methanogenen Archaeen zur CH_4 -Bildung. Der Anstieg der H_2 -Konzentration in Kombination mit rückläufiger CH_4 -Produktion kann also auf eine vorübergehende Störung der hydrogenotrophen Methanogenen und ihrer syntrophen Partner (siehe Kapitel 2.1) in diesem Zeitraum hindeuten, da durch die Bildung von CH_4 aus H_2 und CO_2 , H_2 aus dem Prozess entfernt wird²⁹. Hierdurch könnte der zeitweilig geringere CH_4 -Gehalt im Fermenter durch eine geringere Produktionsrate erklären werden, jedoch könnte jedoch auch durch einen Verdünnungseffekt durch erhöhte CO_2 -Produktion während der Hydrolyse verursacht sein.

Die Anreicherung der Essigsäure spricht für eine funktionierende Acidogenese und Acetogenese im Reaktor. Der Anstieg von Propion- und iso-Valeriansäure nach 120 Tagen kann als Antwort auf den erhöhten H_2 -Partialdruck interpretiert werden, der dazu führt, dass sekundäre Fermentationen aus energetischen Gründen in syntrophen Gemeinschaften nicht mehr stattfinden können²⁷. Der Anstieg der Säure kann ein Indiz für Prozessstörungen sein,

wird allerdings erst ab einer Gesamtkonzentration der Säuren über 3500 ppm und einem Verhältnis Essigsäure : Propionsäure < 2 : 1 als ernstzunehmende Prozessstörung angesehen^{19,152}.

Ein Vergleich der Prozessparameter in Fermenter und Nachgärer zeigt, dass im Nachgärer deutlich geringere Schwankungen der gemessenen Parameter auftreten. Es sind keine nennenswerten Diskrepanzen im CH₄-Gehalt zu beobachten. Die Schwankungen im H₂-Gehalt sind zeitgleich zu denen im Fermenter zu beobachten, aber deutlich geringer ausgeprägt. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass frisches Substrat in den Fermenter eingetragen wird. Substratänderungen und damit verbundene Bedingungsänderungen wirken sich demnach direkt aus. Im Nachgärer kommt bereits vorverdautes Substrat an, das einen deutlich geringeren Anteil an hochmolekularen Verbindungen enthält. Bei Grassilage handelt es sich zudem um ein Substrat mit relativ hohem Gehalt an schwerabbaubarer Lignocellulose¹⁵³. Die zusätzliche Gabe von Körnerschrot nach weiteren 70 Tagen hat keine Änderungen in den Prozessparametern zur Folge. Dies liegt unter anderem daran, dass die Mikrobiologie zu diesem Zeitpunkt bereits etabliert war und somit weniger auf Änderungen reagiert. Ein weiterer Grund ist, dass Körnerschrott aufgrund des geringeren Gehalts an Lignin während der Hydrolyse leichter aufgeschlossen werden kann¹⁵³.

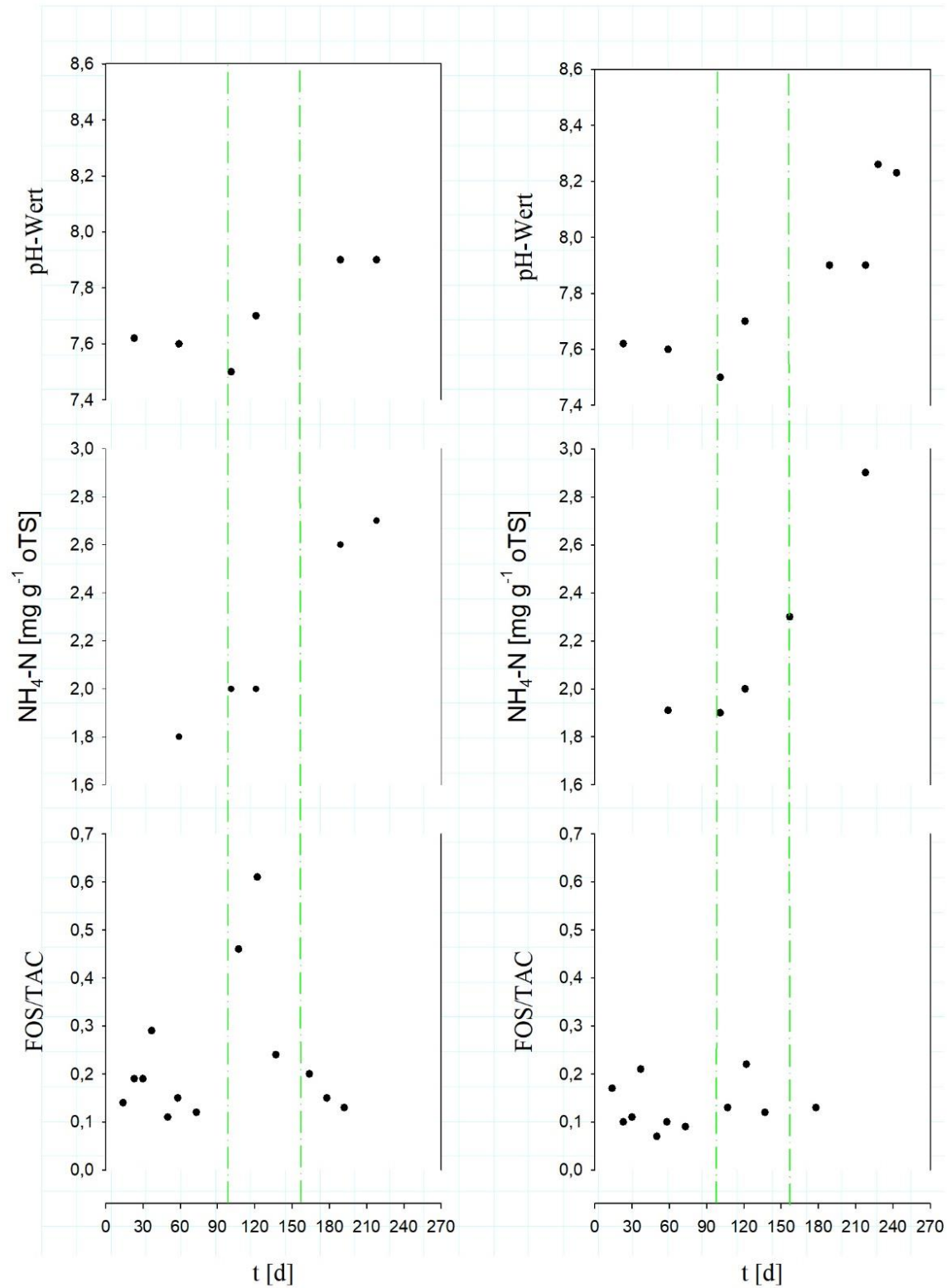


Abbildung 30: Prozessparameter während der Anlaufphase ¹³⁸

Von oben nach unten: pH-Wert, Ammonium-Stickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$)- und FOS/TAC-Werte. Links die Werte im Fermenter und rechts im Nachgärer. Die punktierten Linien markieren Wechsel in der Substratzusammensetzung. Erste Linie: zusätzliche Gabe von Grassilage (nach ca. 100 Tagen). Ab der zweiten Linie, ca. 160 Tage nach Start, wurde zudem Körnerschrot hinzugegeben.

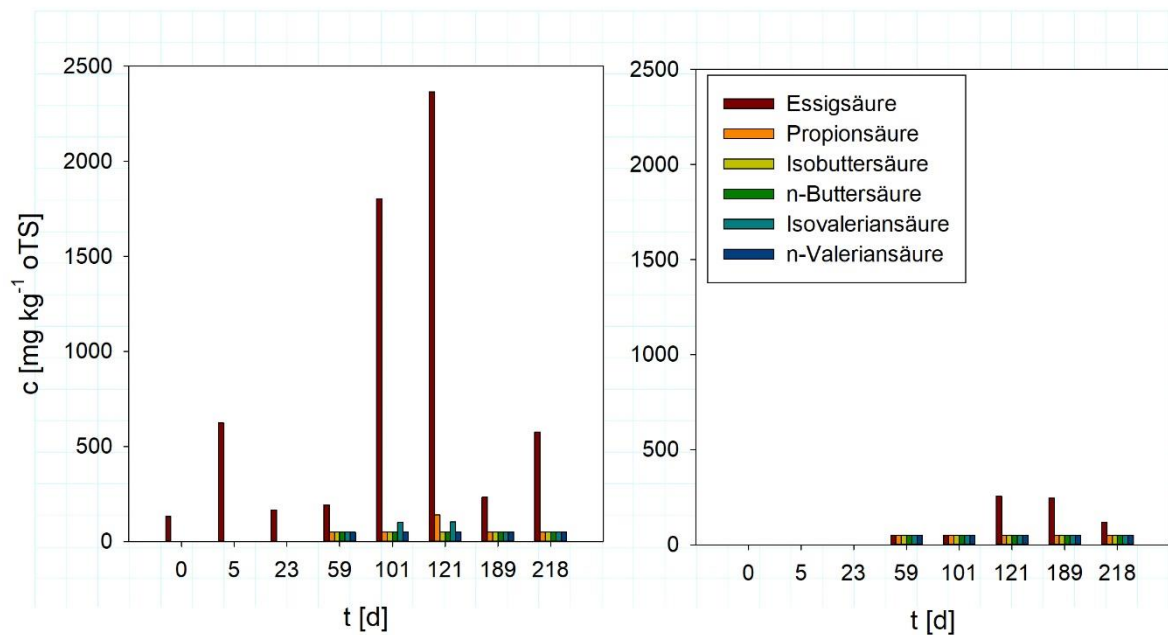


Abbildung 31: Flüchtige Fettsäuren

Die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren sind als gruppierte Balken an den jeweiligen Tagen nach Reaktorstart dargestellt. *Links* im Fermenter, *rechts* im Nachgärer.

4.3.2 Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft

Die Diversität und Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde mittels ARISA und NG-Sequenzierung verfolgt (s. Kapitel 2.2.2). Zudem wurden die *mcrA*-Genkopien mittels qPCR quantifiziert, um die Organismenkonzentration der methanogenen Archaeen im Etablierungsprozess darstellen zu können (s. Kapitel 2.2.4).

Die ARISA erwies sich als robuste, standardisierbare und zudem kostengünstige Methode zur Analyse der mikrobiellen Dynamik (siehe auch Kapitel 4.2) und diente daher als Basis zur Diversitätsanalyse der mikrobiellen Gemeinschaft über den Verlauf des Prozesses. Die Hauptkoordinatenanalyse (PCO) der ARISA-Ähnlichkeitsmatrizen (Abbildung 32) zeigt, dass 88,3 % der methanogenen Archaeen- und 61,9 % der bakteriellen ITS-Fragmentmuster durch drei PCO-Achsen erklärt werden können. Anhand der Cluster kann der Beobachtungszeitraum, in dem jeweils 38 Proben aus Fermenter und Nachgärer analysiert wurden, in vier Zeitphasen eingeteilt werden: *Phase I*, Tage 0-14; *Phase II*, Tage 23-58; *Phase III*, Tage 73-137 und *Phase IV*, Tage 164-233.

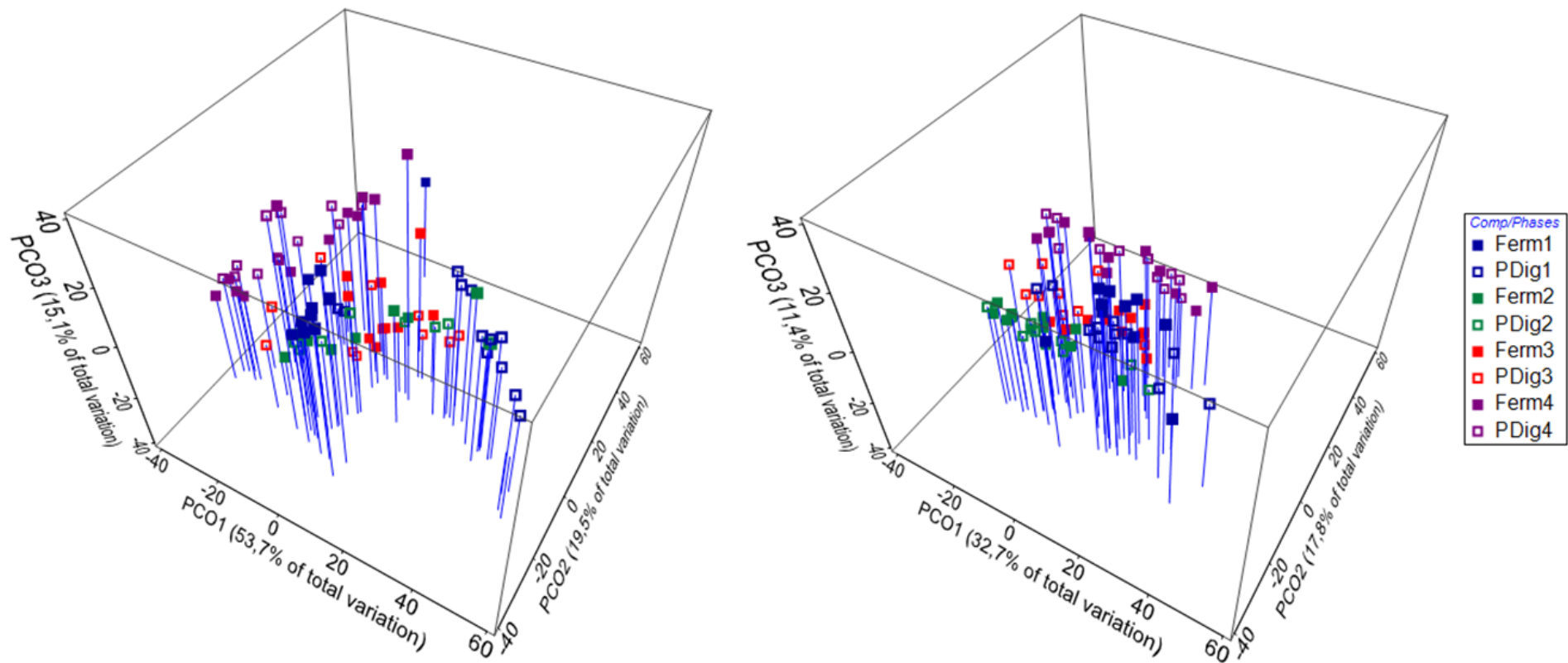


Abbildung 32: Hauptkoordinatenanalyse

Die Hauptkoordinatenanalysen wurden aus den ARISA-Ähnlichkeitsmatrizen für die methanogenen Archaeen (*links*) und die Bakterien (*rechts*) erstellt. Die Proben aus dem Fermenter sind gefüllt (*Ferm*), die aus dem Nachgärer ungefüllt (*PDig*) dargestellt. Es ergeben sich Cluster, die es erlauben den Prozess in Phasen (I-IV) zu unterteilen: Phase I (*blaue Symbole*, Tage 0-14), Phase II (*grüne Symbole*, Tage 23-58), Phase III (*rote Symbole*, Tage 73-137) und Phase IV (*pinke Symbole*, Tage 164-233). Die blauen Linien vereinfachen die Projektion der Datenpunkte auf die x, y-Ebene.

Die Phaseneinteilung wurde mit einer paarweisen statistischen Analyse (ANOSIM) durch den Vergleich von Archaeen und Bakterien in den jeweiligen Kompartimenten belegt (Tabelle 22). Im Fermenter waren die Unterschiede für beide Domänen signifikant ($p = 0,01 - 0,04 \%$), im Nachgärer nahm die Divergenz der ARISA-Muster zwischen den Phasen bei den Bakterien mit der Zeit ($p = 0,01 - 0,10 - 0,50$) ab. Bei den Archaeen findet ein Angleichen zwischen Phase I und III statt ($p = 0,6 - 1,60 \%$). Zwischen Phase III und IV fand nochmals eine signifikante Änderung der Abundanz ($p = 0,01 \%$) statt.

Tabelle 22: Paarweiser statistischer Vergleich der Zeitphasen (ANOSIM, 10.000 Permutationen)

Vergleich der Proben aus der Bakterien- und der Archaeen-Gruppe für Fermenter und Nachgärer hinsichtlich der angegebenen Zeitphasen I-IV. Die vollständigen Daten zur Analyse finden sich im Anhang in Tabelle A 4 und Tabelle A 5.

Kompartiment	Paare	Methanogene Archaeen		Bakterien	
		R-Wert	p-Wert (%)	R-Wert	p-Wert (%)
Fermenter	Phase I -II	0,373	0,02	0,709	0,01
Fermenter	Phase II -III	0,561	0,01	0,527	0,04
Fermenter	Phase III -IV	0,522	0,01	0,457	0,01
Nachgärer	Phase I -II	0,304	0,60	0,565	0,01
Nachgärer	Phase II -III	0,240	1,60	0,231	0,10
Nachgärer	Phase III -IV	0,496	0,02	0,306	0,50

Anhand einer weiteren ANOSIM wurden die Unterschiede zwischen den Fragmentmustern in Fermenter und Nachgärer zur jeweiligen Zeitphase untersucht (Tabelle 23). Es zeigten sich signifikante Unterschiede für die methanogenen Archaeen ($p < 0,01 \%$) und für die Bakterien ($p < 0,01 \%$) während Phase I. Bereits in Phase II gleichen sich die Fragmentstrukturen zwischen Fermenter und Nachgärer deutlich an.

Tabelle 23: Paarweiser statistischer Vergleich der Reaktorkompartimente (ANOSIM, 10.000 Permutationen)

Vergleich der Bakterien- und der Archaeen-Gruppen in Fermenter und Nachgärer in den jeweiligen Phasen.

	Methanogene Archaeen		Bakterien	
	R-Wert	p-Wert (%)	R-Wert	p-Wert (%)
Phase I	0,596	0,01	0,463	0,01
Phase II	0,012	30,70	-0,029	63,40
Phase III	0,049	19,50	0,216	1,70
Phase IV	0,014	29,40	0,027	25,00

Die *Seriations-Analyse* zeigt im untersuchten Zeitraum eine hohe Korrelation zwischen den ARISA-Mustern der aufeinanderfolgenden Proben mit der Zeitachse (Tabelle 24).

Tabelle 24: Seriations-Analyse der ARISA-Muster

Verglichen wurden die ARISA-Muster innerhalb der verschiedenen Probengruppen (Fermenter/Nachgärer, Bakterien/Archaeen) mit Hilfe der Spearman-Korrelation. Die zugehörigen R-Werte wurden unter Verwendung von 999 Permutationen erhalten.

	R-Wert	p-Wert (%)
Methanogene Archaeen		
Fermenter	0,529	<0,1
Nachgärer	0,555	<0,1
Bakterien		
Fermenter	0,552	<0,1
Nachgärer	0,498	<0,1

Die Ergebnisse aus der statistischen Analysen der ARISA-Muster zeigen, dass der Etablierungsprozess in der Anlage in Etappen abläuft. Dies führte während der Anlaufphase der BGA zu einer zeitabhängigen Clusterbildung der ARISA-Muster, was durch den schrittweisen Ablauf des anaeroben Abbauprozesses (Hydrolyse bis Methanogenese) unter Beteiligung einer Vielzahl von Organismen begründet sein könnte (vgl. Tabelle 1). Die

Organismen der verschiedenen Abbaustufen sind sowohl mit den Organismen der Abbaustufen oberhalb wie auch mit den Organismen der darunter stehenden Abbaustufen verbunden und somit voneinander abhängig. Sie müssen einerseits mit Produkten der vorherigen Abbaustufe versorgt werden, andererseits müssen die gebildeten Produkte abgebaut werden. Unregelmäßigkeiten führen zur Akkumulation bestimmter Stoffe. Hieraus resultierend kommen Stoffwechselwege durch Produktinhibition oder Änderung des Redox-Potentials zum Erliegen. Falls möglich weichen die Mikroorganismen jedoch auf alternative Stoffwechselwege aus ²⁷. Das hieraus entstehende neue chemische Milieu führt nach und nach zu einer Änderung der Zusammensetzung der Mikroorganismen. Dass die aus einem bestimmten Substrat entstehenden Produkte wiederum vom Mikroorganismus abhängen, der diese bildet, treibt die Dynamik zusätzlich an. Wie von Gottschalk ¹⁵⁴ beschrieben, variiert die stoffliche und mengenmäßige Zusammensetzung der entstehenden Produkte aus demselben Nährstoffmolekül bereits bei Organismen derselben Gattung deutlich. Besonders in der Anlaufphase ohne etabliertes Milieu entsteht durch diesen Mechanismus ein zeitabhängiger, etappenweiser Etablierungsprozess der mikrobiellen Population. Die zunehmende Abnahme der Dynamik innerhalb der einzelnen Zeitphasen ist ein Beleg für eine Stabilisierung der mikrobiellen Gemeinschaft mit fortschreitender Dauer. Dies erklärt auch die Feststellung aus Kapitel 4.3.1, dass die Prozessparameter durch die erste Erweiterung des Substrates stärker schwanken als bei der zweiten Substraterweiterung nach 160 Tagen. Lucas et al. verfolgten die mikrobielle Dynamik in drei parallelbetriebenen, mesophilen Anlagen im technischen Maßstab, die ebenfalls ausschließlich mit Energiepflanzen gefüttert wurden, über den Zeitraum eines Jahres ¹⁵⁵. Die Autoren fanden eine sehr stabile und untereinander sehr ähnliche Gemeinschaft. Es ist davon auszugehen, dass die gegen Ende des Versuchs rückläufige Dynamik im untersuchten Reaktor ebenfalls auf eine beginnende Stabilisierung zurückzuführen ist.

Die relative Abundanz der Fragmente der methanogenen Archaeen (> 1 %) verhielt sich vergleichsweise stabil innerhalb der vier Zeitphasen (Abbildung 33). Es ist jedoch anzumerken, dass eine Dynamik für einzelne Fragmente auftritt. Das Fragment mit 713 bp ist beispielweise in den ersten Phasen deutlich vertreten, ist aber in Phase IV nicht mehr vorhanden. Dies ist durch die zu Anfang des Kapitels angemerkte, signifikante Änderung der methanogenen Gemeinschaft zwischen Phase III und IV (Tabelle 22) begründet. Das Fragment mit 747 bp hingegen erscheint in signifikanter Abundanz erst in den Phase III und IV. Da die Anzahl der Bakterienfragmente wesentlich höher als die der methanogenen Archaeen war, konnte für die Bakterien keine Tendenz von vorhandenen oder nicht vorhandenen Fragmenten ermittelt werden.

Die Dynamik der Mikrobiologie war im Fermenter deutlich höher als im Nachgärer. Da im Fermenter neues Substrat eingespeist und zunächst hydrolysiert wird, führt dies zu einem deutlich inhomogeneren Fermenterschlämm. Zudem kommen Schwankungen in der Substratqualität verstärkt zum Tragen. Verbunden mit der schnellen Angleichung der mikrobiellen Gemeinschaften der unterschiedlichen Kompartimente, könnte hierdurch erklärt werden, dass sich die in Absatz 4.3.1 aufgezeigten Schwankungen der Parameter im Fermenter mit deutlich höherer Intensität auswirken.

Es ist davon auszugehen, dass die höhere Diversität im Fermenter neben der schwankenden Substratqualität auch durch die Mikroorganismen beeinflusst wird, die durch die Fütterung in das System eingetragen werden. Erwartet werden beispielsweise Bakterien, die für die Milchsäuregärung im Silierungsprozess verantwortlich sind. Diese werden bei der ARISA erfasst, auch wenn sie nicht direkt am Abbauvorgang innerhalb des Fermenters beteiligt sind.

Die ARISA-Analyse kann bei der taxonomischen Bestimmung und phylogenetischen Einordnung nur bedingt eingesetzt werden. Es ist nicht möglich, über die Länge der vervielfältigten ITS-Region auf einen bestimmten Organismus zu schließen. Da mehrere Organismen Fragmente derselben Länge aufweisen können, oder sich die Fragmente nur durch 1-2 bp in der Länge unterscheiden, können so zwei verschiedenen Fragmente bei der Auftrennung zusammenfallen und nicht unterschieden werden. Durch verschieden geartete Mutationen der variablen ITS-Region kann es zum Einbau oder Verlust einzelner Basen oder ganzer Basensequenzen kommen, sodass keine Aussage über die Nähe der Verwandtschaft anhand der Fragmentlänge möglich ist.

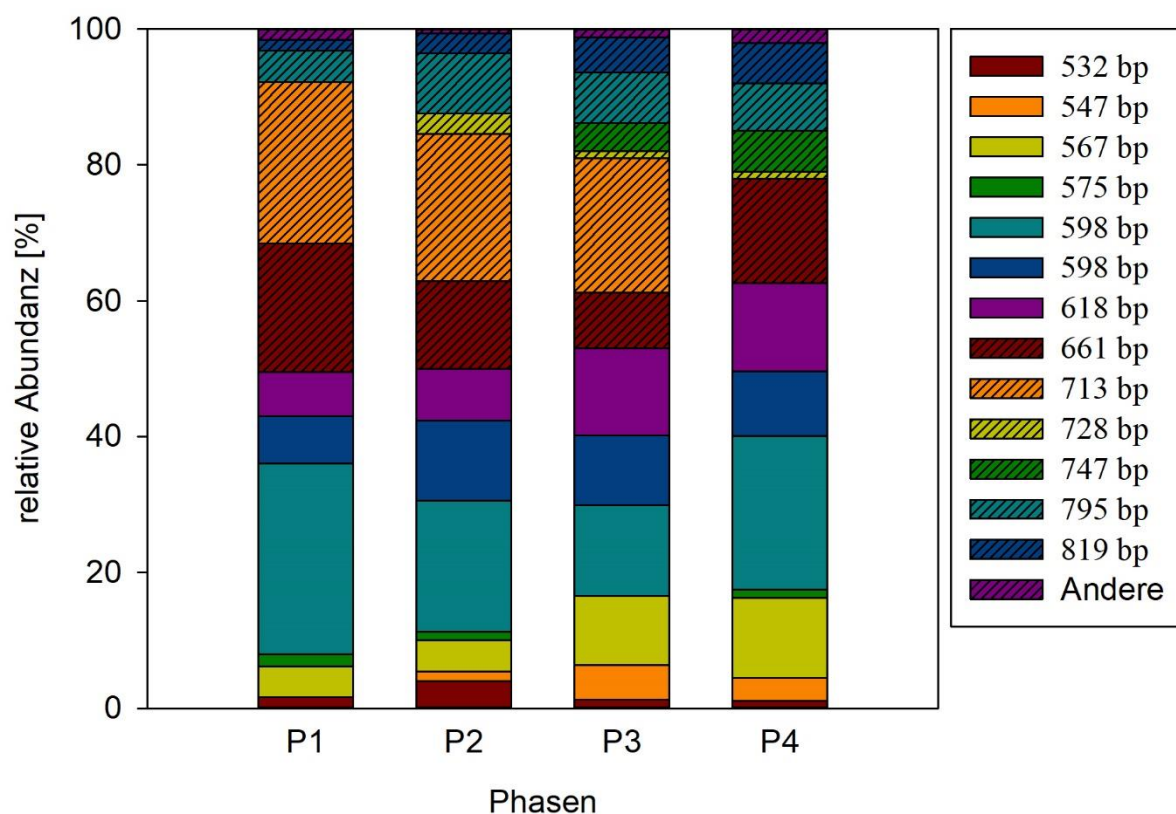


Abbildung 33: Relative Abundanz der ITS-Fragmente der methanogenen Archaeen

Beide Reaktorkompartimente wurden in dieser Analyse zusammengefasst dargestellt. Fragmente, die einen Anteil < 1% repräsentieren, wurden addiert und als „Andere“ zusammengefasst. Die Gesamtabundanz (Summe der normalisierten ARISA-Fragmente) war 251, 360, 351 und 387 für die Phasen I - IV.

4.3.3 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft – NGS-qPCR

Um die mikrobielle Entwicklung während der Anlaufphase der BGA genauer zu untersuchen und beteiligte Organismen zu identifizieren, wurde eine NGS durchgeführt. Hierzu wurden sechs Proben basierend auf den Voruntersuchungen mittels ARISA aus den Phasen II und IV ausgewählt. Es zeigte sich, dass annähernd 95 % der Sequenzen von der Domäne der Bakterien und ein deutlich geringerer Anteil von ca. 4 % der Domäne der Archaeen stammten. Ein geringer Anteil konnte nicht zugeordnet werden. Die Sequenzierung lieferte Ergebnisse bis auf Gattungs-Ebene, in Abbildung 34 ist eine Darstellung auf Ordnung-Ebene dargestellt. Eine ausführliche Tabelle bis auf die Gattungs-Ebene kann aufgrund des Umfangs nicht dargestellt werden. Eine detaillierte Übersicht über die Anzahl der Sequenzen in den jeweiligen Proben ist in Tabelle A 6 dargestellt. Weitere Statistiken bezüglich Anzahl der Sequenzen, operational taxonomic units (OTU), Rarefaction und phylogenetischer Diversität sind in Tabelle A6 und Tabelle A 7 zusammengefasst.

Insgesamt konnten 15 Ordnungen mit einer relativen Abundanz > 1 % identifiziert werden. Hiervon waren sieben der Abteilung *Firmicutes*, zwei der Abteilung *Tenericutes* und jeweils eine der Abteilung *Bacteroidetes*, *SR1* und *WWE1* untergeordnet.

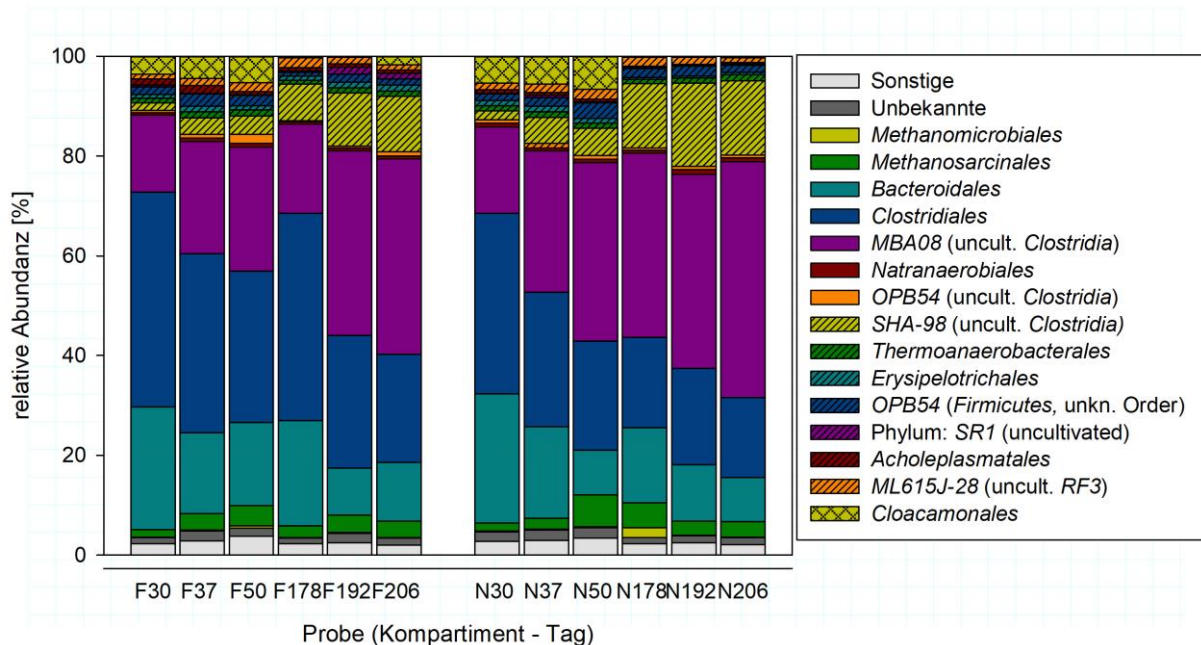


Abbildung 34: Relative Abundanz der 16S-rRNA-Gensequenzen

Zusammensetzung der mikrobiellen Population auf Ordnungsebene zu den ausgewählten Zeitpunkten aus dem Fermenter (F) und aus dem Nachgärer (N). Die Bezifferung entspricht jeweils den Tagen der Probenahme. Sequenzen mit weniger als 1 % der Gesamtmenge sind als „Andere“ zusammengefasst.

Mit der höchsten relativen Abundanz kamen Bakterien der Klassen *Clostridia* mit den Ordnungen *Clostridiales* und *MBA08* sowie Bakterien der Klasse *Bacteroidia* mit der Ordnung *Bacteroidales* vor. In Fermenter und Nachgärer dominieren in der Anfangsphase *Bacteroidales* und *Clostridiales*, während gegen Ende der Beprobungsphase *MBA08* stärker vertreten ist. Zudem nimmt im Zeitraum zwischen 50 und 178 Tagen die Abundanz der *Clostridia* der Ordnung *SHA-98* deutlich dazu, die *Cloacamonales* sind nahezu nicht mehr vorhanden. Bezieht man die in 4.3.1 aufgeführten Parameter mit ein, so fällt auf, dass im Zeitraum zwischen 59 und 189 Tagen ein Anstieg des $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalts um 44 % im Fermenter und 21 % im Nachgärer stattgefunden hat. Dies könnte den Grund für die beschriebenen Änderungen der bakteriellen Population darstellen. Ergebnisse einer Studie, die syntrophe-acetatoxidierenden Bakterien in Biogasreaktoren im Zusammenhang mit der Ammoniumkonzentration untersuchten, stellten ebenfalls fest, dass mit steigender Ammoniumkonzentration Organismen aus der Ordnung *Cloacamonales* durch *Clostridia* der Ordnungen *SHA-98* und *MBA08* verdrängt werden¹⁵⁶. Demzufolge würde die Ammoniumkonzentration bereits während der Anlaufphase eine

wichtige Rolle für die Etablierung der Mikroorganismenpopulation spielen und somit auch in direktem Zusammenhang mit einer schnellen Stabilisierung stehen.

Neben den stark dominanten Vertretern der Klassen *Bacterioidales* und *Clostridiales* kamen auch weniger stark abundante Organismen vor, die während des gesamten Zeitraums etabliert waren. Es wird vermutet, dass diese Organismen trotz geringerer Abundanz wichtig für die Effizienz und Prozessstabilität sind. Beispielsweise konnte ein Vertreter aus der Abteilung *Firmicutes* des nur wenig erforschten *OPB54*-Clusters nachgewiesen werden, der über die gesamte Etablierungsphase mit relativer Abundanz zwischen 1 und 3 % vertreten war. Für einen kultivierbaren Organismus dieses Clusters konnten Liu et al. Kohlenhydratstoffwechsel für eine Vielzahl von Zuckern nachweisen, wobei als Produkte Acetat, Ethanol und H₂ entstanden ¹⁵⁷.

Mikroorganismen, die durch die Fütterung eingetragen werden, jedoch keinen Einfluss auf den Biogasprozess haben, konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Diese könnten einen Beitrag zu der unter 4.3.2 festgestellten Dynamik des Fermenters gegenüber dem Nachgärer leisten. Ein Beispiel ist der zur Klasse *Mollicutes* zählende *Acholeplasmates*, der zu fast allen Zeitpunkten im Fermenter mit einer relativen Abundanz > 1 % nachgewiesen wurde. Organismen dieser Klasse leben parasitär und werden wahrscheinlich mit Pflanzen in den Fermenter eingetragen ¹⁵⁸. Milchsäurebakterien, die eine wichtige Rolle bei der Silierung der Substrate spielen und somit in diesem Zusammenhang auch im Fermenter erwartet werden, konnten ebenfalls nachgewiesen werden, erreichen jedoch zu keinem Zeitpunkt eine relative Abundanz > 1 %.

Zur Darstellung der relativen Abundanz der methanogenen Archaeen, die einen deutlich geringeren Anteil der Gesamtpopulation ausmachen, sind diese separat in Abbildung 35 abgebildet. Die Abbildung enthält alle im Zeitraum vorkommenden Ordnungen. Aufgrund der geringen Anzahl wurde von einem Ausschlusslevel < 1% abgesehen. An dieser Stelle ist es nicht möglich, den Anteil der unbekannten Organismen getrennt zu erfassen. Eine geringfügige Überbewertung der relativen Abundanz kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Die Ordnung *Methanosarcinales* dominierte deutlich über den gesamten Zeitraum, gefolgt von den *Methanomicrobiales*. Beide Ordnungen sind der Klasse *Methanomicrobia* zugeordnet, unterscheiden sich aber grundlegend bei den Substraten, die zur CH₄-Bildung verwendet werden. Spezies der Ordnung *Methanosarcinales* setzen Acetat und Methylverbindungen um, während die Spezies der Ordnung *Methanomicrobiales* CO₂ mittels H₂ als Elektronendonator zu CH₄ reduzieren ¹⁵⁹. Die ebenfalls hauptsächlich hydrogenotrophen *Methanobacteriales* kommen zu einem geringen Anteil bis Tag 50 vor, sind jedoch im späteren Verlauf nicht mehr

nachweisbar.

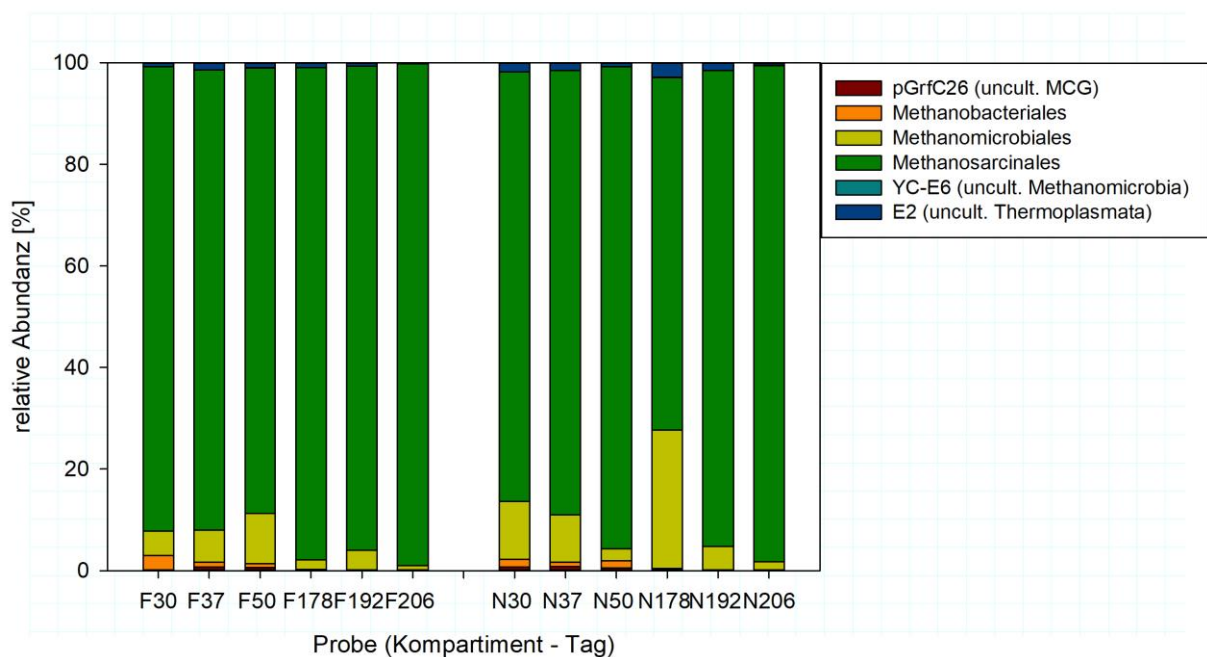


Abbildung 35: Relative Abundanz der Archaeen-16S-rRNA-Gensequenzen

Zusammensetzung der Archaeenpopulation auf Ordnungsebene zu den ausgewählten Zeitpunkten aus dem Fermenter (F) und aus dem Nachgärer (N). Die Bezifferung entspricht jeweils den Tagen der Probenahme.

Abbildung 36 zeigt die quantitative Entwicklung der methanogenen Archaeengemeinschaft in den beiden Reaktorkompartimenten anhand der *mcrA*-Genkopien. Im Fermenter bewegt sich die Anzahl der *mcrA*-Genkopien im Zeitraum bis 120 Tagen im Bereich bis 10^{10} Kopien g^{-1} TS, bevor sie sprunghaft ansteigt und gegen Ende Werte über 10^{11} Genkopien g^{-1} TS annimmt. Die Kopienzahl im Nachgärer zeigt geringere Schwankungen. Sie steigt beinahe kontinuierlich von 4×10^9 auf 10^{11} Kopien g^{-1} TS im Zeitraum bis ca. 160 Tage. Ein Vergleich mit dem CH_4 -Gehalt des im Nachgärer produzierten Biogases (s. Kapitel 4.3.1) zeigt, dass die steigende *mcrA*-Genkopienzahl mit einem tendenziellen Anstieg des CH_4 -Gehalts einhergeht. Im Fermenter liegt die Kopienzahl nach 160 Tagen ebenfalls höher als in den ersten 120 Tagen. Es stellt sich nach dem zeitweiligen Einbruch des CH_4 -Gehalts ebenfalls ein leicht höheres Niveau ein.

Der sprunghafte Anstieg im Fermenter, der zwischen Tag 112 und Tag 119 stattfindet, lässt aufgrund mehrerer, nachfolgend erläutelter Ereignisse, die in den Einflusszeitraum fallen, keinen direkten Rückschluss auf die Ursache zu. Erstens wurde 14 Tage zuvor die Rezirkulation von 80 auf 150 m^3 pro Tag erhöht, um einen geringen Wassergehalt im Fermenter auszugleichen. Es wird vermutet, dass hierdurch hydrolysierte Substrate aus dem Nachgärer vermehrt in den Fermenter eingetragen wurden. Zweitens wurden am Tag vor der Probenahme

50 m³ des Endlagerinhalts in den Fermenter gepumpt. Da keine Probenahme aus dem Endlager erfolgt ist, kann dies nicht überprüft werden. Drittens wurde Grassilage an Tag 99 erstmalig zugegeben. Somit könnte der Anstieg auch durch die Verfügbarkeit eines erweiterten Nährstoffangebots zu erklären sein. In der Standardliteratur (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.) wird die schwankende Qualität von Grassilage und ein erhöhter Stickstoff- und Ligningehalt gegenüber der Maissilage erwähnt ¹⁹. Lebuhn et al. empfehlen die Beimischung von Grassilage zur Maisfermentation aufgrund des höheren Gehaltes an Mikronährstoffen, um Defizite während der Maisfermentation auszugleichen ¹⁶⁰.

Sowohl im Fermenter als auch im Nachgärer sind teilweise sprunghafte Änderungen in der Kopienzahl zu bemerken. Diese Schwankungen können anhand der durchgeführten qPCR-Analysen nicht direkt mit Vorkommnissen bzw. äußeren Einflüssen während der Etablierungsphase in Verbindung gebracht werden. Dies liegt zum einen an der vielschichtigen Zusammensetzung der Archaeenpopulation und deren direkter Abhängigkeit von Nährstoffen, die aus dem Stoffwechsel der Bakteriengemeinschaft entstehen ¹⁶¹, zum anderen an den langen Generationszeiten anaerober Mikroorganismen, die es erschweren, verschiedene Ereignisse direkt mit Schwankungen in Verbindung zu bringen. So beträgt beispielsweise die Generationszeit bestimmter acetatverwendender Archaeen, die im Beprobungszeitraum den größten Teil der Methanogenen ausmachten, bis zu 15 Tage ¹⁶². Dies hat eventuell zur Folge, dass Änderungen der relevanten äußeren Parameter erst Wochen später zu einer Änderung der Kopienzahl führen.

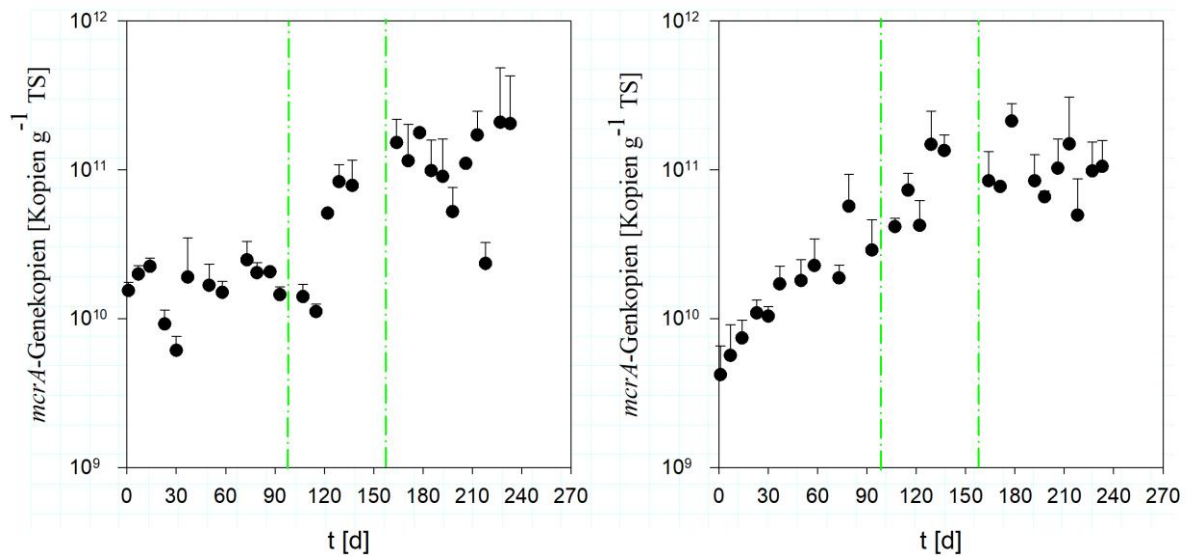


Abbildung 36: Quantifizierung der mcrA-Genkopien

Es sind die Kopienzahlen des mcrA-Gens, *links* im Fermenter, *rechts* im Nachgärer, dargestellt. Die punktierten Linien markieren Wechsel in der Substratzusammensetzung. *Erste Linie*: zusätzliche Gabe von Grassilage (nach ca. 100 Tagen). Ab der *zweiten Linie*, ca. 160 Tage nach Start, wurde zudem Körnerschrot hinzugegeben.

4.3.4 Zusammenfassung

In der Anlaufphase sollte untersucht werden, ob durch Inokulation des Reaktors eine hochdynamische Phase angestoßen wird, die sich mit fortschreitender Zeit beruhigt und zu einem stabilen Prozess führt. Es zeigte sich, dass sich bereits nach ca. 30 Tagen eine weitgehend stabile Gasausbeute, verbunden mit konstantem CH₄-Anteil, einstellte. Die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft war über den gesamten Zeitraum dynamisch und fand in deutlich voneinander getrennten Phasen statt. Über die Zeit stabilisierten sich die Prozessparameter. Dies äußerte sich durch einen Prozess, der weniger auf äußeren Einflüsse reagierte.

4.4 Dynamik einer Trockenfermentationsanlage

Im Folgenden ist ein 95-tägiger Zyklus (drei Perioden) einer Trockenfermentation nach dem Garagenfermentationsprinzip im Labormaßstab dargestellt. Es wurde vermutet, dass sich der Reaktor aufgrund der diskontinuierlichen Verfahrensweise (s. Kapitel 3.5.2) in einem hochdynamischen Zustand befindet, der jedoch auch weniger Schwankungen durch äußere Einflüsse unterliegt.

Der Gasvolumenstrom erreichte jeweils das höchste Niveau zwischen 22 L h⁻¹ (Periode 1) und 25 L h⁻¹ (Periode 2) nach ca. 2-5 Tagen und fiel dann, typisch für die Garagenfermentation, kontinuierlich mit der Zeit ab. Grund für die abnehmende Gasproduktion ist die fehlende Fütterung, wodurch immer schwerer zugängliche Verbindungen zeitintensiver abgebaut

werden müssen. CO₂- und CH₄-Anteil des gebildeten Gases sind in Abbildung 37 dargestellt. Der CH₄-Gehalt erreicht einen maximalen Wert von 60 % in der Phase zwischen 36 und 38 Tagen. Analog zur Anlaufphase in Kapitel 4.3.1 erreicht der CH₄-Anteil im Gas mit Erreichen der Endtemperatur von 45° C ebenfalls einen konstanten Wert. Dieser Wert bleibt innerhalb der jeweiligen Periode weitgehend konstant.

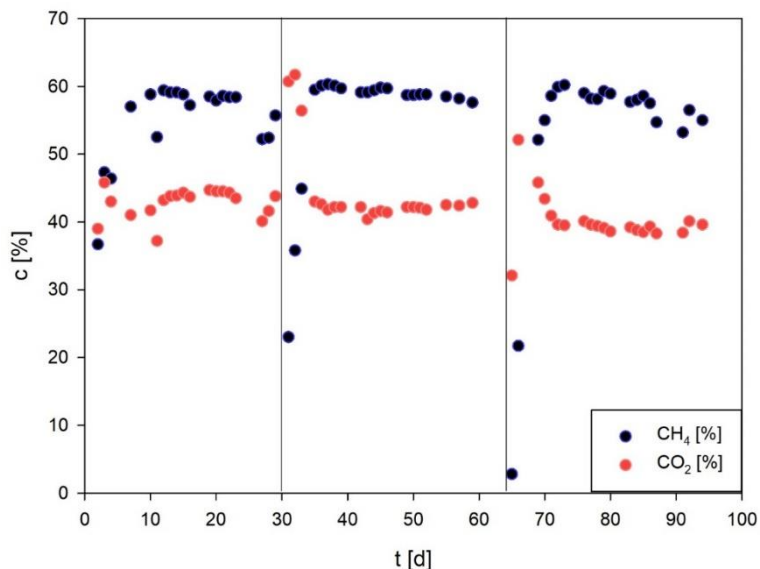


Abbildung 37: Gasparameter der Trockenfermentation

Gezeigt ist CH₄, CO₂ und Gasvolumenstrom während der Fermentation. Ein kompletter Lauf besteht aus drei Perioden, die jeweils aus ca. 30 Tagen bestehen. Die Linien bei 29 und 64 Tagen zeigen jeweils Ende und Beginn einer neuen Fermentationsperiode an.

Die Abundanzmuster der ARISA (Abbildung 38) zeigen nach drei Tagen (T3) noch deutliche Übereinstimmung mit dem Inokulum (P1), anschließend entwickelt sich eine Dynamik, die relativ schnell zu einem neuen Muster führt. Die Dynamik der *bakteriellen* Gemeinschaft scheint sich hierbei deutlich schneller an die Bedingungen im Modellmaßstab zu adaptieren. Bereits an Tag 36 haben sich die Verhältnisse deutlich verschoben. Das in beiden Proben aus der technischen Anlage (P1 und P2) stark dominante Fragment mit 368 bp verliert deutlich an Abundanz, während das Fragment bei 265 bp eine höhere Abundanz aufweist. Nach der Inokulation zu Beginn des Experiments kommen Fragmente > 3 % dazu, die im technischen Fermenter nicht auftreten. Bereits zu T3 kommt das Fragment mit 536 bp hinzu, zudem an T36 unter anderem die Fragmente der Längen 332, 411 und 418 bp sowie ab T60 noch das Fragment der Länge 434 bp, die bis zum Ende der Fermentation bestehen bleiben. Die statistisch paarweise ANSOSIM der Abundanzmuster, bei der insgesamt 15 ARISA-Proben aus den

Perioden I-III sowie die Perkolatproben aus der technischen Anlage analysiert wurden, zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Perioden, siehe Tabelle 25. Eine Signifikanz (p-Wert = 4,7 %) ergab lediglich der Test zwischen Perkolat und Periode III. Dies spricht für eine Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft, die sich über die Zeit von der technischen Anlage entfernt und zur Etablierung einer neuen Zusammensetzung führt.

Bei den *Archaeen* ist ein ähnlicher Vorgang zu beobachten, der jedoch aufgrund der deutlich längeren Generationszeit mehr Zeit beansprucht. So können sich die Fragmente der Längen 576 und 621 bp etablieren, während das Fragment der Länge 721 bp, das in der technischen Anlage deutlich vertreten ist, im Garagenfermenter nicht mehr vorkommt. Der paarweise statistische Vergleich ergibt zwar keine signifikanten Werte zwischen dem Perkolat und den einzelnen Proben, jedoch nähern sich die Werte beim Vergleich Perkolat zu Periode I und II (P-Wert = 6,7 und 7,1) einer Signifikanz an. Vergleicht man die Perioden miteinander, so deuten die Werte auf eine hohe Dynamik in den ersten 30 Tagen hin (p-Wert = 5,7), während in den letzten 30 Tagen ein p-Wert von 90,5 % für eine hohe Homogenität spricht.

Tabelle 25: Paarweiser statistischer Vergleich der Fermentationsperioden (ANOSIM, 10.000 Permutationen)

Es wurde ein paarweiser geordneter Test zwischen den einzelnen Perioden sowie der Periode mit dem Perkolat aus der technischen Anlage (Perkolat) durchgeführt. Die vollständigen Daten befindet sich in im Anhang (Tabelle A 8; Tabelle A 9).

Paare	Methanogene Archaeen		Bakterien	
	R-Wert	p-Wert (%)	R-Wert	p-Wert (%)
Perkolat – Periode I	0,464	20	0	40
Perkolat – Periode II	1	6,7	0,164	38,1
Perkolat – Periode III	0,469	7,1	0,691	4,8
Periode I – Periode II	0,604	5,7	-0,075	65,9
Periode I – Periode III	0,083	29,5	0,038	31
Periode II – Periode III	-0,167	90,5	-0,008	47,6

Wie bereits in der Untersuchung der Anlaufphase (Kapitel 4.3) findet auch bei der Garagenfermentation ein Wandel der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit statt. Die mikrobielle Gemeinschaft entfernt sich über die Zeit von der ursprünglichen Zusammensetzung

des Inokulum. Dieser Vorgang erfolgt im Garagenfermenter deutlich schneller als bei der technischen Anlage, bei der sich die Populationsdynamik über die gesamte Spanne von 240 Tagen in signifikante Phasen einteilen lässt (s. Tabelle 22). Ein möglicher Grund ist, dass bei der Garagenfermentation nach Verschließen des Reaktors ein abgeschlossenes System geschaffen wird, das im Unterschied zu herkömmlichen Biogasreaktoren keinen zusätzlichen Faktoren durch den Eintrag von Substrat ausgesetzt ist. Ebenfalls eine wichtige Rolle spielt der deutlich kleinere Maßstab, der wahrscheinlich ebenfalls zu einer schnelleren Etablierung beigetragen hat.

Nach jeder Periode wurde der Reaktor geöffnet und ein Drittel des Substrates durch frisches ersetzt. Es wurde deshalb erwartet, dass die Substratzusammensetzung Schwankungen aufweist. Die mikrobielle Gemeinschaft im Modellreaktor reagierte bereits nach 30 Tagen kaum auf den Wechsel und erreichte nach Verschließen des Fermenters nach kurzer Zeit wieder konstante CH₄-Konzentrationen, die zudem kaum Schwankungen aufweisen. Dies deutet bereits zu diesem Zeitpunkt auf eine stabile Gemeinschaft hin. Dies steht im Gegensatz zum Rührreaktor, der nach hundert Tagen mit einem Einbruch des CH₄-Gehalts auf einen Wechsel in der Substratzusammensetzung reagierte und erst bei einem zweiten Wechsel nach ca. 180 Tagen stabil blieb.

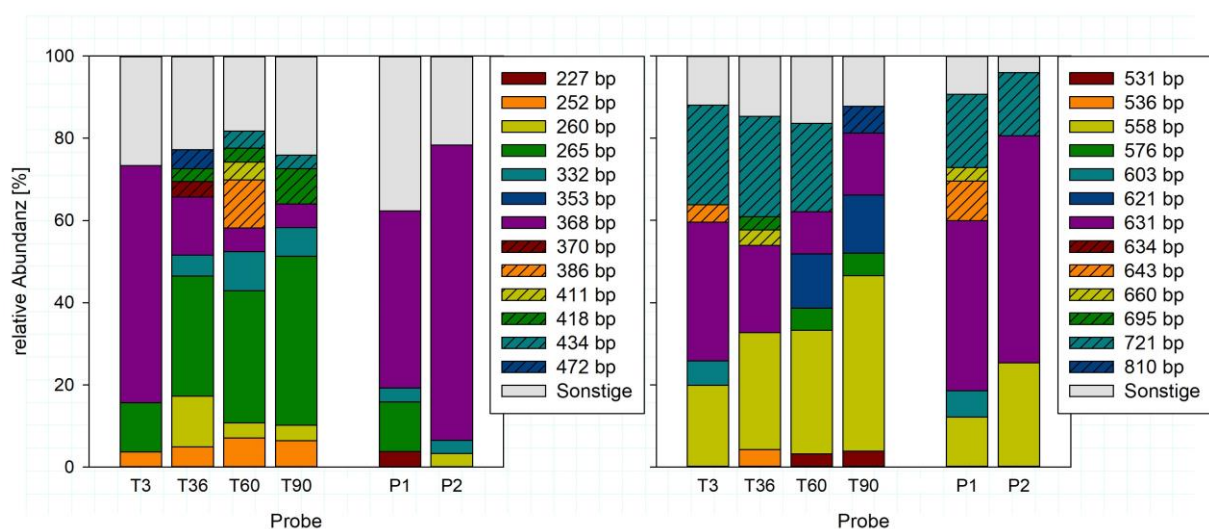


Abbildung 38: Relative Abundanz der ITS-Fragmente bei der Trockenfermentation

Links die Abundanzen der Bakterien, *rechts* die der Archaeen an den Tagen drei (T3), 36 (T36) und 62 (T62) sowie aus den Perkolatproben (P1, P2). P1 wurde für die erste Inokulation des Reaktors verwendet. 1L von P2 wurde bei der Inokulation zu Beginn der dritten Periode verwendet.

4.5 Flexibilisierung der mikrobiellen Gemeinschaft

Ziel der Substratflexibilisierung ist die bedarfsgerechte Biogasproduktion. An Praxisbeispielen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch flexibilisierte Verstromung des Biogases und der bedarfsgeregelten Einspeisung eine Steigerung von durchschnittlich 0,18 ct/kWh auf 0,51 ct/kWh zu erreichen ¹⁶³. Um für solche Modelle zusätzlich eine bedarfsgerechte Biogasproduktion zu ermöglichen, ist ein schneller Rückgang der Gasproduktion nach Beendigung der Fütterung notwendig, um möglichst wenig Überschussgas zu erzeugen und einen Ausbau des Speichervolumens zu vermeiden. Zudem muss eine effektive Steigerung nach Erhöhung der Substratgabe bei gleichzeitiger Stabilität des Prozesses erreicht werden.

4.5.1 Prozessdynamik

In Abbildung 39 sind Raumbelastung, Gasertrag und CH₄-Gehalt dargestellt und zudem die Intervalle in Phasen I bis VI eingeteilt. Aufgrund der sich häufig ändernden Intervalle wurde zur Bewertung der Flexibilität des Prozesses die prozentuale Abnahme des CH₄-Gehalts jeweils drei Tage nach erhöhter Substratzufuhr berechnet. Maximaler und minimaler Rückgang der jeweiligen Intervalle sind in Tabelle 26 dargestellt. Für Intervall VI konnte dieser Wert aufgrund des kurzen Zeitraums nicht ermittelt werden. Je nach Intervall konnten Einsparungen des produzierten Gasvolumens drei Tage nach minimalisierter Fütterung von 29 – 89 % erreicht werden.

Tabelle 26: Rückgang der CH₄-Konzentration, drei Tage nach erhöhter Substratgabe

Intervall	Max. Rückgang	Min. Rückgang
	Gasvolumen [%]	Gasvolumen [%]
I	89	70
II	67	29
III	74	72
IV	72	58
V	55	39

Nachdem der Reaktor für 331 Tage kontinuierlich beschickt wurde, begann ab Tag 332 die erste Flexibilisierung (I). Zu Beginn der Flexibilisierungsphase wurde die Raumbelastung, gesteuert über die Zufütterung, von 6,4 auf 1,0 kg oTS m⁻³d⁻¹ verringert und anschließend im Zeitraum bis 430 Tage immer wieder für drei bis vier Tage auf Werte von ca. 1,3 kg oTS m⁻³d⁻¹, ab 430 Tagen auf Raumbelastungen von ca. 2 kg oTS m⁻³d⁻¹ reduziert. Dazwischen wurde die Raumbelastung immer für Zeiträume von zwei Tagen auf Werte zwischen 6 und 7 kg oTS

$\text{m}^{-3}\text{d}^{-1}$ erhöht. Im Weiteren wurde die Raumbelastung bis Tag 464 auf einem Niveau von $2,1 \text{ kg oTS m}^{-3}\text{d}^{-1}$ konstant gehalten. Der CH_4 -Gehalt des Gases beträgt im Zeitraum bis Tag 464 zwischen 50 und 74 %. Der Gasertrag geht jeweils innerhalb des ersten Tages nach der Substratreduzierung deutlich auf ca. $1/5$ des Wertes vor der Reduzierung zurück. Drei Tage nach Reduzierung des Substrates geht die Gasproduktion um 70 – 89 % zurück. Nach Erhöhung der Fütterungsmenge dauert es im Schnitt zwei Tage, bis der maximale Gasertrag erreicht wird. Der Anstieg findet meist in zwei Etappen statt. Zunächst zeigt sich ein deutlicher Anstieg um das 5- bis 6-fache am ersten Tag nach der Fütterung. Am darauffolgenden Tag steigt der Wert nochmals leicht an. Die VFAs zeigen keine Auffälligkeiten durch die Flexibilisierung. Aufgrund der Vielzahl der Proben ist in Tabelle 27 eine Auswahl dargestellt, die sich auf die Punkte der Probenahmen für die Populationsanalysen beschränkt. Im Anhang in Tabelle A 10 sind alle gemessenen Werte zusammengefasst.

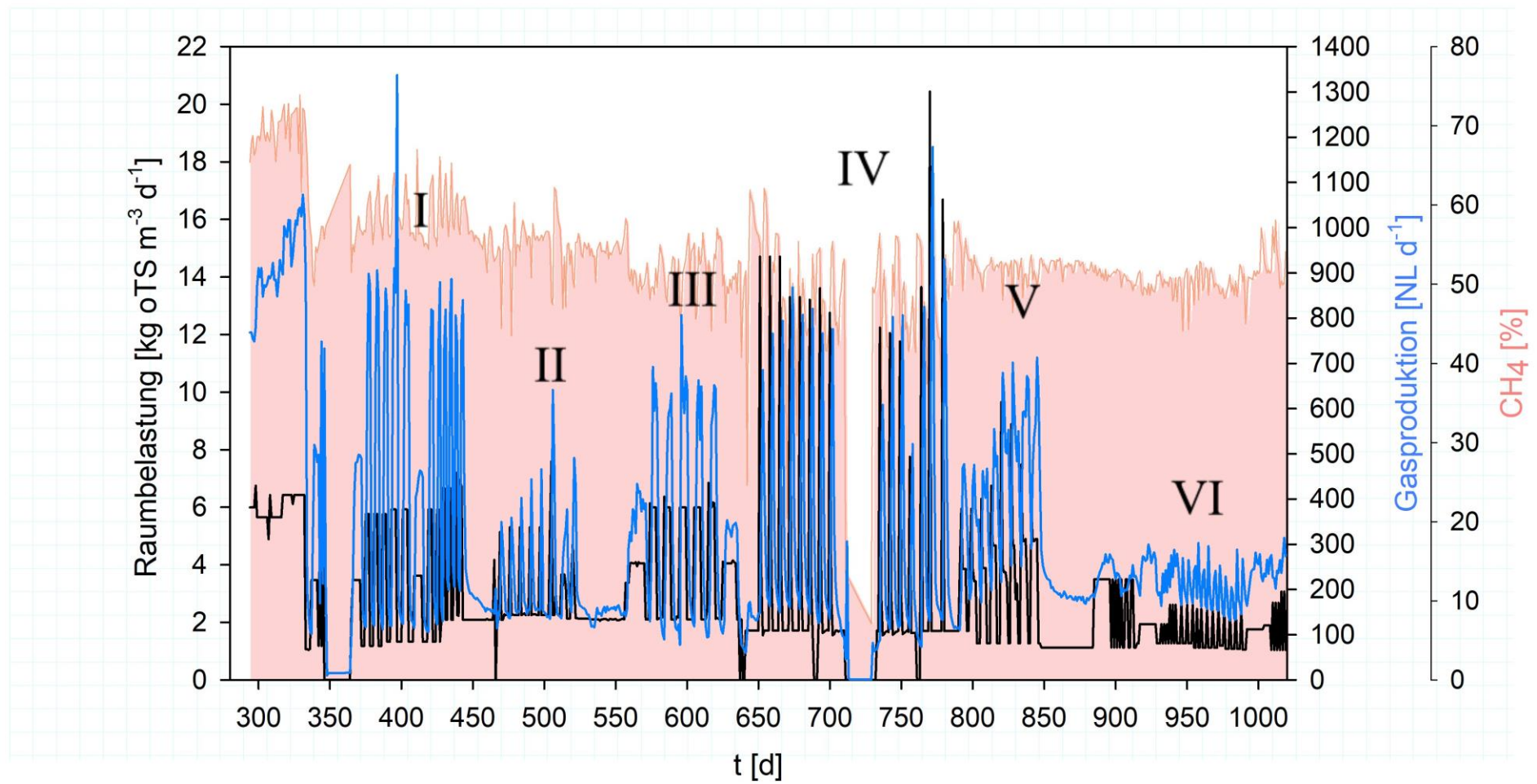


Abbildung 39: Raumbelastung, Gasertrag und CH₄-Anteil bei der Flexibilisierung

Tabelle 27: pH-Wert und VFAs bei der Flexibilisierung

Dargestellt sind der pH-Wert, die Konzentrationen an Essigsäure, Propionsäure, iso- und n-Buttersäure sowie iso- und n-Valeriansäure an ausgewählten Zeitpunkten. Vollständige Auflistung im Anhang (Tabelle A 10)

t [d]	pH-Wert	Essigs. [mg/L]	Prop. [mg/L]	i-Butter. [mg/L]	n-Butter. [mg/L]	i-Val. [mg/L]	n-Val. [mg/L]
311	7,87	500	0	0	0	0	0
318	7,82	0	0	0	0	0	0
325	7,75	0	0	0	0	0	0
365	7,59	0	0	0	0	0	0
437	7,5	0	0	0	0	0	0
465	7,8	0	0	0	0	0	0
521	7,7	173	97	0	0	0	0
542	7,7	0	0	0	0	0	0
612	7,9	0	0	0	0	0	0
654	7,8	120	155	0	0	0	0
707	7,7	0	0	0	0	0	0
731	7,7	0	0	0	0	0	0
794	7,7	138	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
834	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
878	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
891	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
997	7,5	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50

Es zeigen sich in dieser Phase keine Auffälligkeiten der Säurekonzentrationen, die durch die Flexibilisierung hervorgerufen werden. Lediglich bei der Messung an Tag 322 (vor der Flexibilisierung) wird eine Akkumulation festgestellt, die zu Konzentrationen von 1269 mg L⁻¹ (Essigsäure), 769 mg L⁻¹ (Propionsäure), 41 mg L⁻¹ und 868 mg L⁻¹ (Iso-/n-Buttersäure) sowie 51 und 52 mg L⁻¹ (Iso-/n-Valeriansäure) führt. Die Säuren werden jedoch in den folgenden drei Tagen wieder vollständig abgebaut.

Die H₂-Konzentration (Abbildung 40) befindet sich meist in Bereichen unter 100 ppm, steigt jedoch phasenweise stark an. Zu den Messungen der Tage 380, 423, 453, 460 und 464 wird die Bestimmungsgrenze von 3000 ppm erreicht. Die hohen Werte finden sich dabei stets in Zeiträumen mit reduzierter Raumbelastung, bauen sich allerdings innerhalb von ein bis zwei

Tagen immer wieder vollständig ab. Ein solcher Abbau findet auch, scheinbar unabhängig von der Fütterungsmenge, innerhalb von Zeiträumen mit geringer Raumbelastung statt.

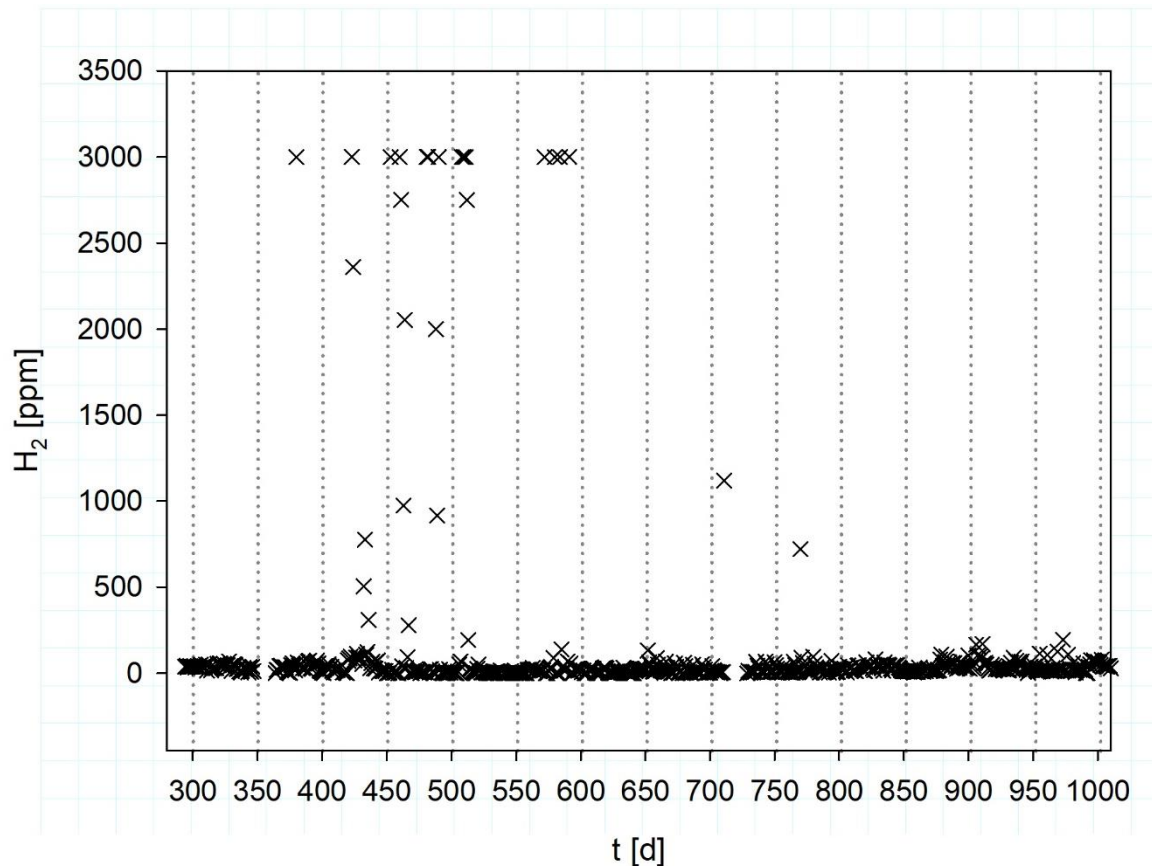


Abbildung 40: H₂-Konzentration während der Flexibilisierung

Es sind die H₂-Konzentrationen während des Prozesses dargestellt. Erfassungsgrenze der Analyse waren 3000 ppm.

Ab Tag 465 beginnt Phase II mit einer Grundbelastung im Bereich von 2 kg oTS m⁻³d⁻¹ für sechs Tage, mit jeweils einem Tag erhöhter Fütterung auf eine Raumbelastung von ca. 5 kg oTS m⁻³d⁻¹. Es ist zu beobachten, dass der Produktionsrückgang mit jedem Intervall zunimmt. Drei Tage nach Fütterung geht der Gasertrag zunächst um 29 % zurück, im letzten Intervall von Phase II werden bereits 67 % weniger Gas drei Tage nach erhöhter Fütterung produziert.

Anders als beim vorherigen Intervall wird der höchste Gasertrag jeweils am Folgetag der Substratsteigerung erreicht. Die Steigerung fällt im Vergleich zu Phase I mit Steigerungen um das 2- bis 3-fache deutlich gemäßiger aus. Der H₂-Gehalt steigt zwischen Tag 481 und 483 sowie zwischen Tag 488 und 490 deutlich auf Werte zwischen 915 und > 3000 NL d⁻¹ an, normalisiert sich aber in Folge schnell wieder. Die VFAs zeigen während dieses Intervalls keine Besonderheiten.

Die an Tag 574 startende Phase III wechselt zwischen jeweils fünf Tagen mit einer Raumbelastung von ca. 2 kg oTS m⁻³d⁻¹ und fünf Tagen mit ca. 6 kg oTS m⁻³d⁻¹. Der CH₄-Gehalt des Gases ist in dieser Phase etwas geringer und befindet sich in einem Bereich zwischen 46 und 56 %. Drei Tage nach erhöhter Fütterung geht das Gasvolumen d⁻¹ um 72 bis 74 % zurück. An den Tagen 580, 584 und 591 wurden H₂-Werte über 3000 ppm gemessen. Die Fettsäuren zeigten keine Akkumulation.

In Phase IV ab Tag 650 wurde die maximale Raumbelastung nochmals erhöht. Das Intervall wurde durch eine Fütterungspause zwischen Tag 711 und 733 unterbrochen. Im ersten Abschnitt wurden jeweils an einem Tag Raumbelastungen zwischen 13 und 15 kg oTS m⁻³d⁻¹, am darauffolgenden Tag ca. 3 kg oTS m⁻³d⁻¹ erreicht, dann wurde für fünf Tage auf Belastungen zwischen 1,5 und 1,7 kg oTS m⁻³d⁻¹ reduziert. Der Gasertrag erreicht jeweils am Tag nach der Fütterung mit 3 kg oTS m⁻³d⁻¹ sein Maximum. Drei Tage nach einer Fütterung mit hoher Belastung geht der Gasertrag am Anfang des ersten Intervalls um 58 % zurück. In den folgenden Intervallen wird die Verwertung stetig effizienter und das produzierte Gasvolumen drei Tage nach hoher Belastung nimmt stetig ab. Drei Tage nach der Fütterung an Tag 701 geht der Ertrag um 72 % zurück. Nach der 21-tägigen Fütterungspause wird zunächst zwei Tage mit Grundbelastung gefüttert und anschließend eine Raumbelastung von 12,24 kg oTS m⁻³d⁻¹ erreicht. Trotz der vorherigen Pause der Fütterung wird das Substrat effizient verwertet. Der Gasertrag steigt direkt am Tag nach der Fütterung auf das 5-fache an, drei Tage nach Fütterung ist die Produktion wieder um 72 % gefallen. Nach Tag 750 wurde jeweils nur noch für einen Tag die Raumbelastung erhöht, an den Tagen 770 und 779 auf maximale Werte von 20 und 17 kg oTS m⁻³d⁻¹. Dies hat in beiden Fällen einen Anstieg der Produktion um den Faktor 7 zur Folge. Durch die extrem hohe Raumbelastung an den Tagen 770 und 779 wird der Abfall der Gasproduktion verzögert, in den drei Tagen nach der Fütterung geht diese um 43 und 45 % zurück. In Folge der höheren Raumbelastung steigt der Gehalt der VFA jeweils kurzzeitig an. Die Säuren werden in Folge innerhalb von zwei Tagen wieder abgebaut. Höhere Akkumulation beschränkt sich auf die kürzerkettigen Säuren Essigsäure und Propionsäure. Butter- und Valeriansäure werden an einigen Zeitpunkten nachgewiesen, jedoch in niedriger Konzentration. Größere H₂-Konzentrationen wurden, mit Ausnahme des Tages nach maximaler Raumbelastung von 20 kg oTS m⁻³d⁻¹ mit 721 ppm, zu keinem Zeitpunkt des Intervalls festgestellt.

Im Fütterungsintervall V ab Tag 791 wurde jeweils für vier bis fünf Tage mit Raumbelastungen zwischen 4 und 6 oTS m⁻³d⁻¹ gefüttert und anschließend zwei bis drei Tage auf ca.

1,3 oTS m⁻³d⁻¹ reduziert. Die durch dieses Intervall entstehenden Ertragsminderungen sind zunächst geringer, nehmen aber, wie bereits bei vorherigen Phasen beobachtet, mit der Zeit zu. Der Ertrag geht nach drei Tagen mit geringer Fütterung zunächst lediglich um 39 % zurück, im letzten Intervall dieser Phase werden 55 % weniger Gas produziert. Der CH₄-Gehalt des Gases befindet sich in einem Bereich zwischen 48 und 53 %. Während des gesamten Intervalls erreicht die maximale H₂-Konzentration 82 ppm. Es gibt keine besonderen Anreicherungen der VFAs.

Ab Tag 885 wurden Kartoffeln für die Flexibilisierung zugegeben, zunächst kontinuierlich bis Tag 896. Zur Grundbelastung von ca. 1 oTS m⁻³d⁻¹ wurden die Kartoffeln in Folge in Intervallen von ein bis drei und gegen Ende des Versuchs in Intervallen von vier Tagen zugegeben, um die Raumbelastung auf Werte zwischen ca. 2 und 3 oTS m⁻³d⁻¹ zu erhöhen. In diesem Zeitraum wurden Gaserträge zwischen 299 und 144 NL d⁻¹ erzielt. Es finden keine nennenswerten Anreicherungen von VFAs oder H₂ statt.

Mauky et al. berichten von einem maximalen Rückgang der Produktion um 60 % bei Fütterungsstopp. Zudem zeigte sich der Prozess über eine Dauer von 190 Tagen stabil. Die Autoren bemerkten lediglich moderate Änderungen der CH₄- CO₂- und Fettsäurezusammensetzung, sowie Änderungen im pH-Wert, die mit der Fütterung in Zusammenhang gebracht werden konnten ⁷⁸. Die Stabilität des Prozesses im vorliegenden Experiment war über den gesamten Zeitraum der 700-tägigen Flexibilisierung gegeben, trotz stark abweichender Intervalle und Raumbelastungen. Die Säuredynamik war ebenfalls vorhanden und führte in einigen Fällen zu einer Absenkung des pH-Wertes, der jedoch in der gesamten Versuchsdauer im neutralen Bereich lag. Die durch Fermentation gebildeten VFAs wurden durch die Acetogenese zu Essigsäure abgebaut und schließlich von acetoklastischen Archaeen zu CH₄ umgewandelt. Eine Hemmung der Acetogenese spiegelt sich in der Anreicherung von Propion-, Butter- und Valeriansäure wieder ¹⁹. Vereinzelt wurden erhöhte Konzentrationen der VFAs beobachtet. Allerdings wurden diese innerhalb kurzer Zeit wieder abgebaut. Dies deutet auf keine Prozessstörung hin, sondern auf eine substratmengenbedingte, vorübergehende Überlastung einzelner Abbauewege. Hierfür spricht auch der mehrfach beobachtete Effekt, dass der prozentuale Anteil des gebildeten Gasvolumens drei Tage nach erhöhter Substratgabe bei mehrmaliger Wiederholung eines Intervalls abnimmt. Es lässt sich deshalb auf eine Anpassung der Mikrobiologie an die jeweiligen Füttermengen und Intervalle schließen. Für einen solchen Effekt sprechen auch die aufgezeichneten H₂-Konzentrationen, s. Abbildung 40. H₂, der nicht abgebaut wird, spricht für eine Überlastung der hydrogenotrophen Archaeen, die hauptsächlich für die Entfernung von H₂ aus dem Prozess verantwortlich sind.

Durch die teilweise hohen Raumbelastungen entstehen hohe Mengen an H_2 , u.a. bei der Bildung von Essigsäure. Es ist möglich, dass die langsam wachsenden Archaeen sich erst nach einiger Zeit anpassen und dies während der ersten 600 Tage des Versuchs gehäuft zu sehr hohen Konzentrationen (> 3000 ppm) führt. Zudem kann sich im Reaktor mit fortschreitender Zeit die Aktivität syntropher Organismen intensiviert haben (2.1). Hier spielen räumliche Faktoren eine wichtige Rolle. Finden sich entsprechende Organismen über die Zeit zusammen und bilden Mikrohabitate aus, sorgt dies dafür, dass gebildeter H_2 sehr effektiv verwertet wird.

Mauky et al. gelang es zudem, die Fütterung der Anlage für drei Tage auszusetzen und im Anschluss durch Fütterung wieder an die Gasproduktion anzuknüpfen ⁷⁸. In den vorliegenden Experimenten wurde eine Fütterungspause von 21 Tagen durchgeführt. In Folge kommt die Biogasproduktion innerhalb kurzer Zeit beinahe vollständig zum Erliegen. Unmittelbar nach Wiedereinsetzen der Fütterung begann erneut die Gasproduktion mit annähernd derselben Produktionsrate wie vor der Fütterpause.

Mulat et al. untersuchten die Auswirkungen der Substratflexibilisierung auf die Prozessperformance und die mikrobielle Gemeinschaft bei der Vergärung von Trockenschlempe ⁷⁹. Es wurden verschiedene Intervalle von zwei Stunden, einem und zwei Tagen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch längere Pausen zwischen den Fütterungsintervallen (1d, 2d) eine höhere Methanausbeute und eine höhere Prozessstabilität einstellte. Tatsächlich zeigte sich im vorliegenden Versuch ebenfalls, dass bei den meisten der getesteten Intervalle der maximale Gasertrag erst nach zwei Tagen nach der erhöhten Substratgabe erreicht wird. Zudem scheint die Gasproduktion und Methanausbeute nicht zwangsläufig von der Raumbelastung, sondern hauptsächlich vom Fütterungsintervall abhängig zu sein. In Phase I wurde beispielsweise ein ähnliches Gasvolumen bei deutlich geringerer Raumbelastung erzeugt als in Phase IV.

4.5.2 Mikrobielle Dynamik

Um einen Einblick in die mikrobiellen Vorgänge während der Flexibilisierung zu erhalten, wurde das Mikrobiom des Reaktors zu verschiedenen Zeitpunkten mittels NGS analysiert. Details der Sequenzanalyse sind in Tabelle A 11 und Tabelle A 12 im Anhang zusammengefasst. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ähnlichkeitsmatrizen zeigt, dass 71 % der NGS-Abundanzmuster durch drei Achsen erklärt werden können (Abbildung 41). Der Trend indiziert eine zunächst weitgehend stabile mikrobielle Gemeinschaft, die durch flexibilisierte Substratgabe einen Neuordnungsprozess durchläuft und sich zum Ende hin wieder stabilisiert.

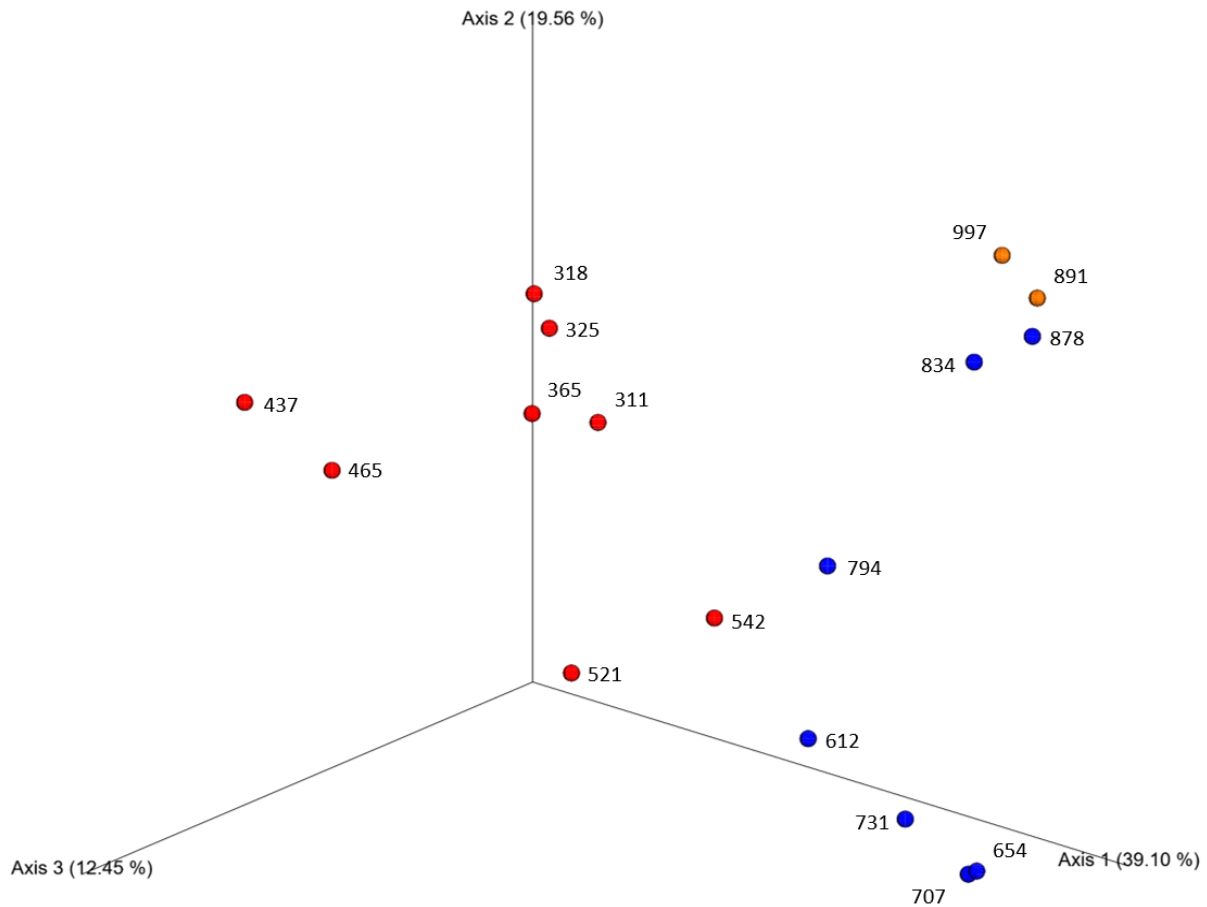


Abbildung 41: Hauptkomponentenanalyse

Die PCA basiert auf der Bray-Curtis-Ähnlichkeit zwischen allen Proben. Die jeweiligen Farben zeigen die Substratzusammensetzung an. Rot: Gülle + Getreide, blau: Gülle + Getreide + Mais, Orange: Gülle + Mais + Kartoffeln. Die Versuchsdauer in Tagen, an der die jeweilige Probenahme stattfand, geht aus der Nummerierung hervor.

Die Proben aus dem Zeitraum zwischen 311 und 365 Tagen befinden sich im Koordinatensystem auf engem Raum, was auf eine stabile und etablierte Gemeinschaft im Reaktor hindeutet. Der Beginn der Substratflexibilisierung an Tag 332 zeigt keine größeren Auswirkungen im unmittelbaren Anschluss. Ab Tag 437 beginnt eine Dynamik, die sich nach Tag 465 vorsetzt. Parallel hierzu zeigt die relative Abundanz der Organismen temporäre Änderungen (Abbildung 42). Ausschließlich in den Proben 437 und 465 kommen Vertreter der Familie *Coriobacteriaceae* mit einer relativen Abundanz von 21 und 18 % vor. Zudem reduziert sich die relative Abundanz der aus der Ordnung *Bacteroidales* stammenden Vertreter der Familie *Porphyromonadaceae* deutlich von 54 auf 29 % und schließlich auf 18 %. Bei den Vertretern der Archaeen findet ein Wechsel innerhalb der Ordnung *Methanosarcina* statt;

Vertreter der Familie *Methanosaetaceae* lösen die Vertreter der Familie der *Methanosarcinaceae* ab.

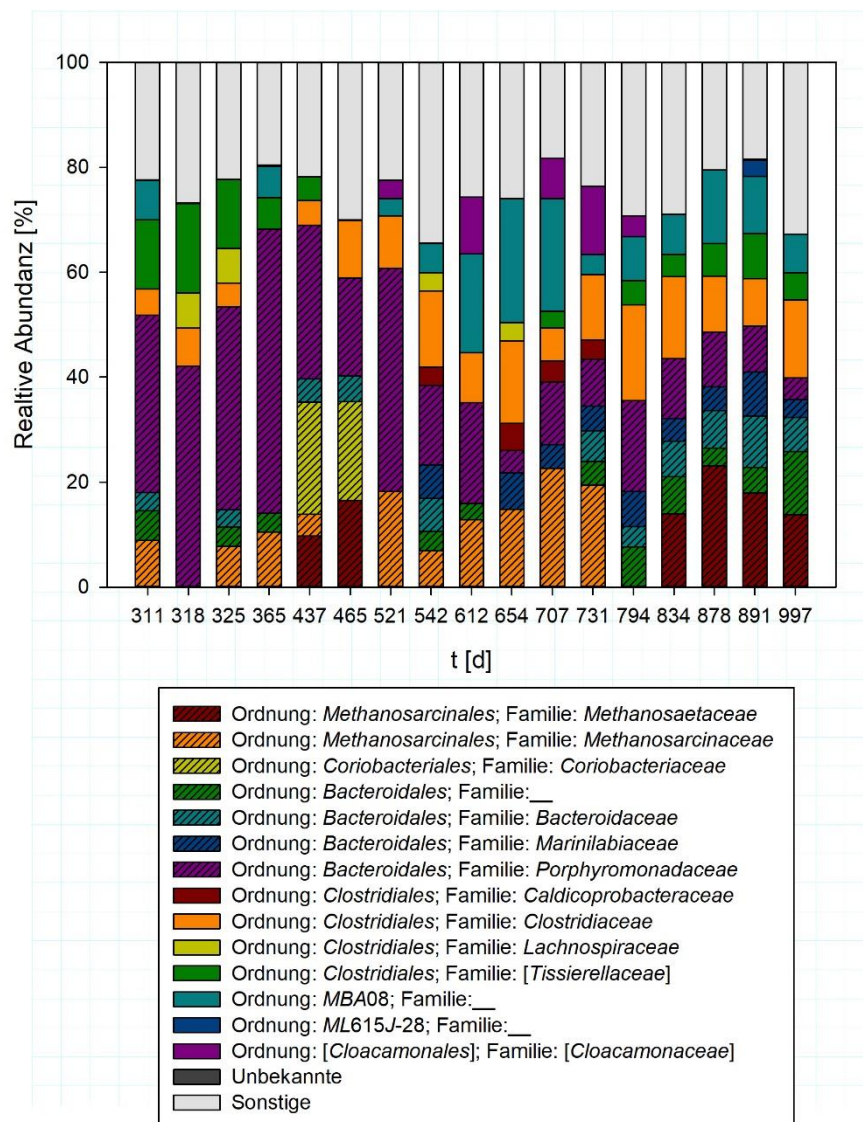


Abbildung 42: Dynamik der mikrobiellen Population während der Substratflexibilisierung

Zusammensetzung der mikrobiellen Population auf Ordnungsebene zu den ausgewählten Zeitpunkten. Gensequenzen mit weniger als 3 % der Gesamtmenge sind als „Sonstige“ zusammengefasst. Die Bezifferung entspricht jeweils den Tagen der Probenahme.

Ein erneuter Wandel der Zusammensetzung der Gemeinschaft führt schließlich zu einer erneuten Clusterbildung, die auf eine stabile mikrobielle Gemeinschaft von Tag 834 bis zur letzten Probenahme an Tag 997 schließen lässt (Abbildung 41). Zum Beispiel bildet sich der Cluster bereits zum Zeitpunkt von Probe 834, in der Mitte von Intervall-Phase V (s. Abbildung 39, Abschnitt 4.5.1). Sowohl die darauffolgende Substraterweiterung um die Komponente Kartoffeln und den Wegfall von Getreide, als auch eine 45-tägige Phase mit konstanter,

minimaler Raumbelastung ($1,13 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) sowie der Wechsel in ein neues Fütterungsintervall führen kaum mehr zu Änderungen der mikrobiellen Zusammensetzung. Allgemein hin scheint die Substratzusammensetzung einen eher untergeordneten Einfluss auf die Ausbildung des Mikrobioms des Reaktors zu haben. Wie in Abbildung 41 farblich dargestellt, führt die Substratzusammensetzung nicht erkennbar zur Bildung spezieller Cluster. Während der Substratänderungen zwischen den Probenahmen der Tage 542 und 612 ist bereits eine hohe Dynamik vorhanden, bei der Änderung zwischen 878 und 891 findet kaum eine Reaktion statt. Letzteres bestätigt, ebenfalls in Hinsicht auf die Resultate aus der Untersuchung der Anlaufphase (s. Kapitel 4.3), die Vermutung, dass die mikrobielle Gemeinschaft zu diesem Zeitpunkt gefestigt war. Während der Anlaufphase hat eine erste Substratänderung in der frühen Phase deutliche Auswirkungen auf die Stabilität, während eine weitere Substratänderung zu einem späteren Zeitpunkt, als die mikrobielle Entwicklung weniger dynamisch war, kaum mehr Auswirkungen zeigte. Eine separate Darstellung der Archaeen zeigt, dass die Ordnung der *Methanosarcinales* in allen Proben deutlich dominiert (Abbildung 43).

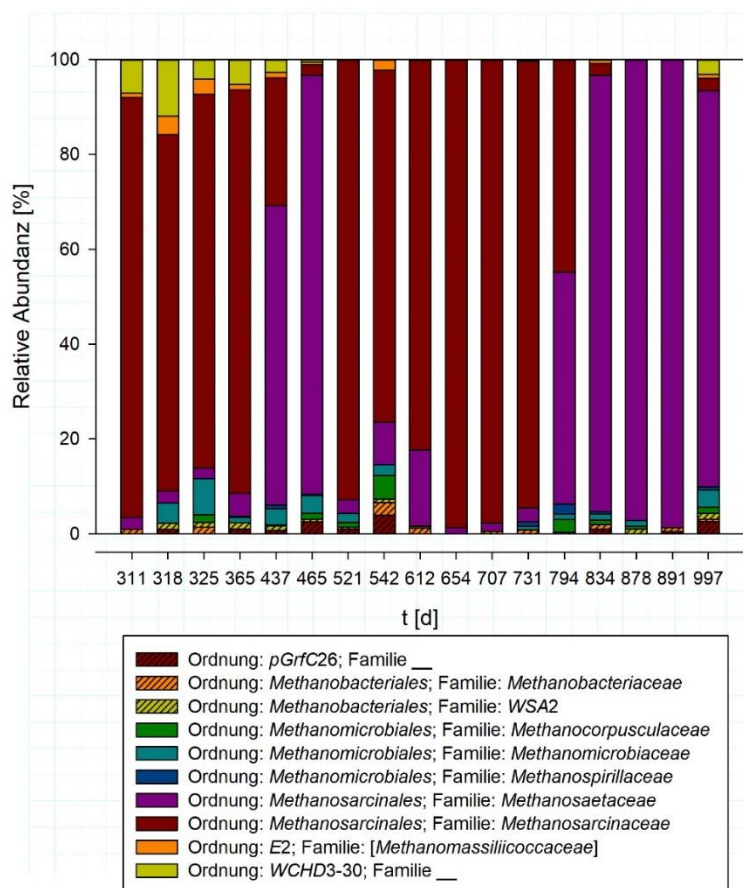


Abbildung 43: Dynamik der Archaeen-Population während der Substratflexibilisierung

Zusammensetzung der mikrobiellen Population auf Ordnungsebene zu den ausgewählten Zeitpunkten. Die Bezifferung entspricht jeweils den Tagen der Probenahme.

Die Ordnung der *Methanosarcinales* beinhaltet zwei Familien, die *Methanosaetaceae* und die *Methanosarcinaceae*, die sich neben einigen anderen Merkmalen auch durch die Substrate für die Methanogenese unterscheiden ¹⁶⁴. Während *Methanosaetaceae* strikt acetoklastisch sind, können Vertreter der *Methanosarcinaceae* Substrate umsetzen, die Methylgruppen enthalten, hydrogenotrophe Methanogenese betreiben oder ebenfalls Acetat umsetzen ^{164,165}. Beide Familien kommen im Laufe des Versuchs vor und wechseln sich als dominante Vertreter ab. Mit Ausnahme der Probe von Versuchstag 794 dominiert immer eine Familie deutlich. Während vor und zu Beginn der Flexibilisierung *Methanosarcinaceae* dominieren, ist ab der Probenahme an Tag 794 ein Wechsel festzustellen, der dazu führt, dass gegen Ende beinahe ausschließlich *Methanosaetaceae* bestimmt werden. Diese Umordnung geht mit der bereits erwähnten Stabilisierung der Gemeinschaft einher. Methanogene Archaeen weisen ein sehr langsames Wachstum und eine hohe Resonanz auf verschiedene toxische Substanzen auf ¹⁶⁵. Zudem fungieren sie als letztes Glied in der Methanbildungskette und sind von vielfältigen Bedingungen aus den vorhergehenden Abbaustufen abhängig. Dadurch können Faktoren für diese Vorgänge bei der weitgehend unerforschten Substratflexibilisierung nicht exakt identifiziert werden. In Untersuchungen von Mulat et al. wurden dem Prozess über einen Flexibilisierungszeitraum von 81 Tagen Substrate in Intervallen von 2 h, 2 Tagen und 3 Tagen zugeführt. Die T-RFLP-Untersuchung zeigte, dass sich die Archaeen-Gemeinschaft stabil verhielt und von *Methanosarcina* aus der Familie *Methanosarcinaceae* dominiert war. Die Isotopenuntersuchung zeigte, dass die durchschnittliche Menge an CH₄, das aus acetoklastischer oder hydrogenotropher Methanogenese stammt, nicht durch die Fütterungsintervalle beeinflusst war ⁷⁹.

Die Vermutung von Loewen et al. ¹⁶⁶, dass die Substratflexibilisierung durch die mikrobielle Gemeinschaft limitiert ist und diese bei unterschiedlichen Fütterungsraten destabilisiert wird, wird nicht bestätigt. Der Prozess weist trotz des Wandels der mikrobiellen Gemeinschaft immer eine funktionierende Methanogenese auf, auch bei hohen Raumbelastungen von bis zu 20 kg oTS m⁻³ d⁻¹ (> dreifache Raumbelastung bei Normalbetrieb) in Intervall V. Dies wird neben dem stabilen CH₄-Gehalt (s. Abschnitt 4.5.1, Abbildung 39) auch durch die VFA-Konzentrationen (s. Tabelle A 10) bestätigt. Eine nicht funktionierende Methanogenese hätte zu einem Abbruch bei der Acidogenese und somit zu einer Akkumulation der VFAs geführt ¹⁶⁵.

Dies war jedoch nur vereinzelt über kurze Zeiträume von ein bis drei Tagen der Fall, bevor sich der Prozess nach und nach stabilisierte (s. Absatz 4.5.1 und Tabelle A 10)

4.5.3 Zusammenfassung

Die Annahme, dass durch die Substratflexibilisierung ein Prozess angestoßen wird, der zur Etablierung einer an die Bedingungen angepassten mikrobiellen Gemeinschaft und zu einem langzeitstabilen Prozess führt, wurde untersucht. Die flexible Substratgabe führte zu einer Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft, die sich erst nach ca. 500 Versuchstagen für 160 Tage bis zum Versuchsende hin zu stabilisieren scheint. Wichtige Indikatoren wie Fettsäure und H₂-Gehalt zeigten in der zweiten Hälfte des Versuches wenig Veränderungen. Dies weist auf eine Stabilisierung des Prozesses hin. Trotz sich ändernder mikrobieller Zusammensetzung wurde über den Zeitraum von 700 Tagen ein stabiler Prozess, mit weitgehend konstantem CH₄-Gehalt im Gas, erreicht. Die Durchführbarkeit einer Flexibilisierung wird durch den Rückgang des Gases nach Fütterungsstopp, verbunden mit erneuter Produktion bei wiedereinsetzender Substratgabe, deutlich. Im Versuch konnte ein maximaler Rückgang der Gasproduktion um bis zu 80 % innerhalb eines Tages erreicht werden.

4.6 Organische Dünger als Eintragsweg für Mikroplastik in die Umwelt

Es wurden die organischen Dünger untersucht, die aus anaerober Vergärung (*BG-A, B, C, D*) sowie aus der aeroben Kompostierung (*KP8mm, KP15mm*) von Biomüll stammen, sowie aus Anlage 5 (Tabelle 8) zur ausschließlichen Vergärung von Energiepflanzen. Um die ermittelten Ergebnisse zu bestätigen und zu vergleichen, wurden zudem Gärreste aus weiteren zehn landwirtschaftliche Anlagen (*Anlagen 1-5; 7-11*) sowie ein kommerziell erworbener Flüssigdünger aus der anaeroben Vergärung von Lebensmittelabfällen (FD) einem Screening unterzogen. Inhalte dieses Kapitels sind in Weithmann et al. 2018 veröffentlicht ¹⁶⁷.

4.6.1 Polymerpartikel in landwirtschaftlichen Anlagen

Die Anzahl an gefundenen MPP größer 1 mm sind in Tabelle 28 dargestellt. Hierbei ist jeweils die Anzahl der Partikel, die in der gesamten Probe von 1,5 L gefunden wurden, sowie die daraus hochgerechnete Partikelzahl kg⁻¹ TS dargestellt. Es konnte nur in drei der Anlagen ein polymerbasierter Störstoff >1 mm nachgewiesen werden. Dies führt bei einer Hochrechnung der gefundenen Partikel zu einem maximalen Wert von 11,4 Partikeln kg⁻¹ TS.

Tabelle 28: MPP > 1 mm in Gärresten landwirtschaftlicher BGAs

Anlage Nr.	MPP [Partikel 1,5 L ⁻¹]	MPP [Partikel kg ⁻¹ TS]	Polymertyp
1	0	0	-
2	0	0	-
3	1	8,16	Unb. Polymer
4	0	0	-
5	0	0	-
7	0	0	-
8	0	0	-
9	1	11,40	PVC
10	0	0	-
11	1	10,02	PP

Als mögliche Kontaminationsquellen genannt werden, können Folien, die beim Silieren verwendet werden, unsachgerechte Entsorgung von Abfall am Straßenrand oder Partikel, die durch Wind auf den großflächigen Äckern verteilt werden. In Studien, die durch Wind verteiltes Plastik als Eintragsweg in terrestrische Ökosysteme aufzeigen, werden Mülldeponien als Ursprung genannt ^{168,169}, die in den untersuchten Gebieten allerdings nicht vorhanden sind.

Da in keiner der Proben eine signifikante Anzahl an Partikeln gefunden werden konnte, legt die Studie nahe, dass rein landwirtschaftlich betriebene Anlagen in der untersuchten Region einen vernachlässigbaren Beitrag zum Eintrag von MPP in die Umwelt leisten.

4.6.2 Polymerpartikel in Düngern aus organischen Reststoffen

Da zur Verpackung von Nahrungsmitteln und irrtümlich auch zur Verpackung von Bioabfällen, häufig Kunststoffverpackungen und Folien eingesetzt werden, wurde erwartet und durch die Untersuchung bestätigt, dass in allen untersuchten Proben Plastikpartikel gefunden werden konnten.

Die Partikelanzahl in den Proben aus der Garagenfermentationsanlage lag zwischen 14 Partikeln kg^{-1} TS in der Perkolatprobe (BG-D) und 146 Partikeln kg^{-1} in der minderqualitativen Kompostprobe BG-C (Tabelle 29). Eine ähnliche Partikelzahl wurde in den Proben der hohen Qualität, BG-B mit 122 und BG-A mit 70 Partikeln kg^{-1} gefunden. Die höchste Partikelzahl mit 752 Partikeln kg^{-1} befand sich in der Probe des kommerziell erhältlichen Komposts aus der anaeroben Vergärung von Lebensmittelresten (FD). Weniger Partikel ergaben die Siebungen der Komposte aus der aeroben Kompostierung. Die feinere Siebung (KP8mm) enthielt 21, die gröbere Siebung (KP15mm) 23 Partikel. Im Gärrest aus der landwirtschaftlichen Anlage (LaWi-5), der zusätzlich als Referenzprobe mitgeführt wurde, konnte kein Partikel nachgewiesen werden.

Größe Typ und Morphologie der gefundenen Partikel: Bei der FTIR-ATR-Analyse konnten insgesamt 13 verschiedenen Kunststoffe nachgewiesen werden (Tabelle 28). Während die hochqualitativen Dünger, die während des Herstellungsprozesses eine längere Lagerzeit und eine zusätzliche Siebung durchlaufen, hauptsächlich styrol-basierende Polymere beinhalten (BG-A 73 %, BG-B 80 %), enthielt der kürzer gereifte Kompost (BG-C) zum größten Teil PES (38%). Da die Probenahme simultan erfolgte, die Komposte aber unterschiedlich lang gereift waren, könnte der Unterschied in der Zusammensetzung durch saisonale Schwankungen des Bioabfalls begründet sein. In FD waren styrol-basierende Polymere mit einem prozentualen Anteil von 46 % vorhanden, gefolgt von PE mit einem Anteil von 32 %.

Tabelle 29: Abundanz der Mikroplastikpartikel

Dargestellt ist die Abundanz der unterschiedlichen Polymersorten, die in den jeweiligen Proben (KP: Biomüllkompostierung, BG: Biomüllvergärung, FD: Flüssigdünger (Partikel >1mm)) gefunden wurden, in der Einheit kg⁻¹ TS. A: Anteil der jeweiligen Sorte in [%].

	KP8mm		KP15mm		BG-A		BG-B		BG-C		BG-D		FD	
	MPP kg ⁻¹	A [%]	MPP kg ⁻¹	A [%]	MPP kg ⁻¹	A [%]	MPP kg ⁻¹	A [%]	MPP kg ⁻¹	A [%]	MPP kg ⁻¹	A [%]	MPP kg ⁻¹	A [%]
styrol- basierendes Polymer	12	60	10	42	51	73	97	80	10	7	0	0	346	46
PES	1	5	0	0	2	3	2	2	56	38	14	100	12	2
PE	6	30	8	33	6	9	3	2	31	21	0	0	239	32
PP	0	0	4	17	3	4	2	2	24	16	0	0	24	3
PET	0	0	1	4	0	0	0	0	16	11	0	0	24	3
zellulose- basierendes Polymer	0	0	0	0	6	9	11	9	5	3	0	0	0	0
PVDC	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
PVC	1	5	1	4	0	0	5	4	2	1	0	0	23	3
Latex	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
PUR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Copolyester Ecoflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	8
PA	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	24	3
Σ MPP	20		24		70		122		146		14		752	

In den organischen Düngern aus den Anlagen zur Vergärung von biogenen Abfällen konnten, verglichen mit den landwirtschaftlichen Anlagen, deutlich höhere Partikelzahlen gefunden werden. Die typischen Formen von MPP sind Kugeln, Fragmente und Fasern. Einige MPP sind in Abbildung 44 dargestellt. Die meisten Partikel waren Fragmente (75-100 %) gefolgt von Fasern (0-8 %) und Kugeln (0-8 %).

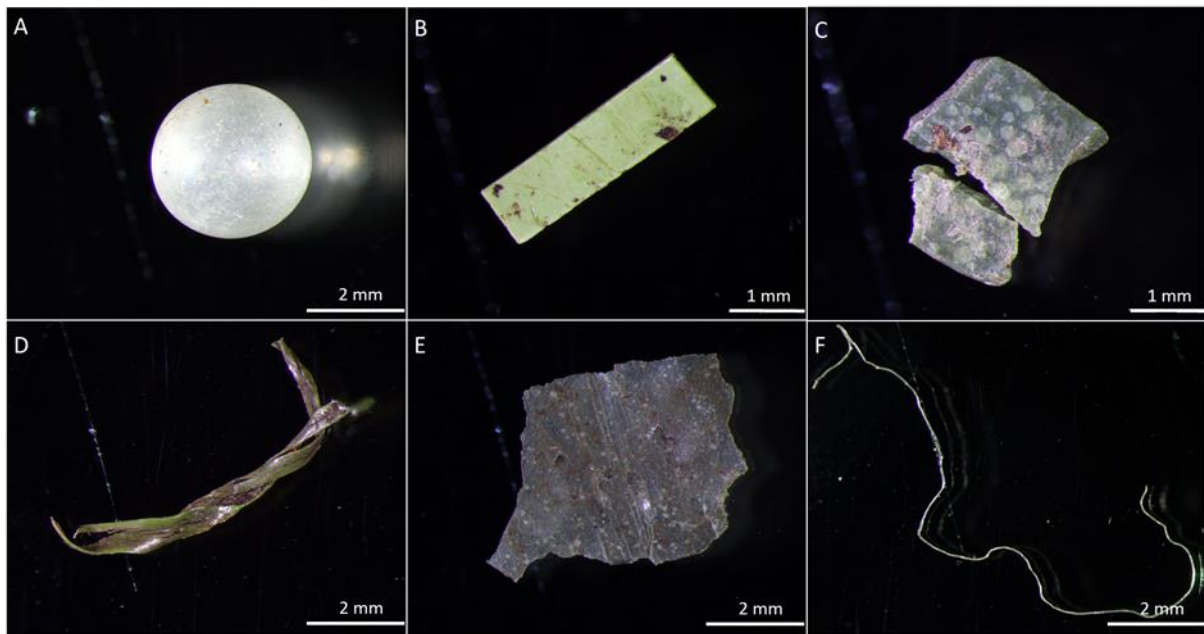


Abbildung 44: Beispiele unterschiedlicher MPP

A) Polyethylen Kugel, B) Polyvinylchlorid Fragment, C) PVC-Partikel, D & E) Polyethylen Fragment, F) Polypropylen Faser.

Die Größenverteilung der MPP in den jeweiligen Proben sind in Abbildung 45 dargestellt. In den Proben BG (A, B, C) sowie in den KP-Proben ist anteilig die Fraktion zwischen zwei und fünf mm am häufigsten vertreten. Einzige Ausnahme stellt das Perkolat dar, indem die häufigste Fraktion im Bereich zwischen 1-2 mm liegt. Dies kann durch einen Filtereffekt der Schüttung begründet sein, in der beim Durchfließen des Perkolats viele der größeren Partikel hängen bleiben und sich diese in der Feststofffraktion wiederfinden.

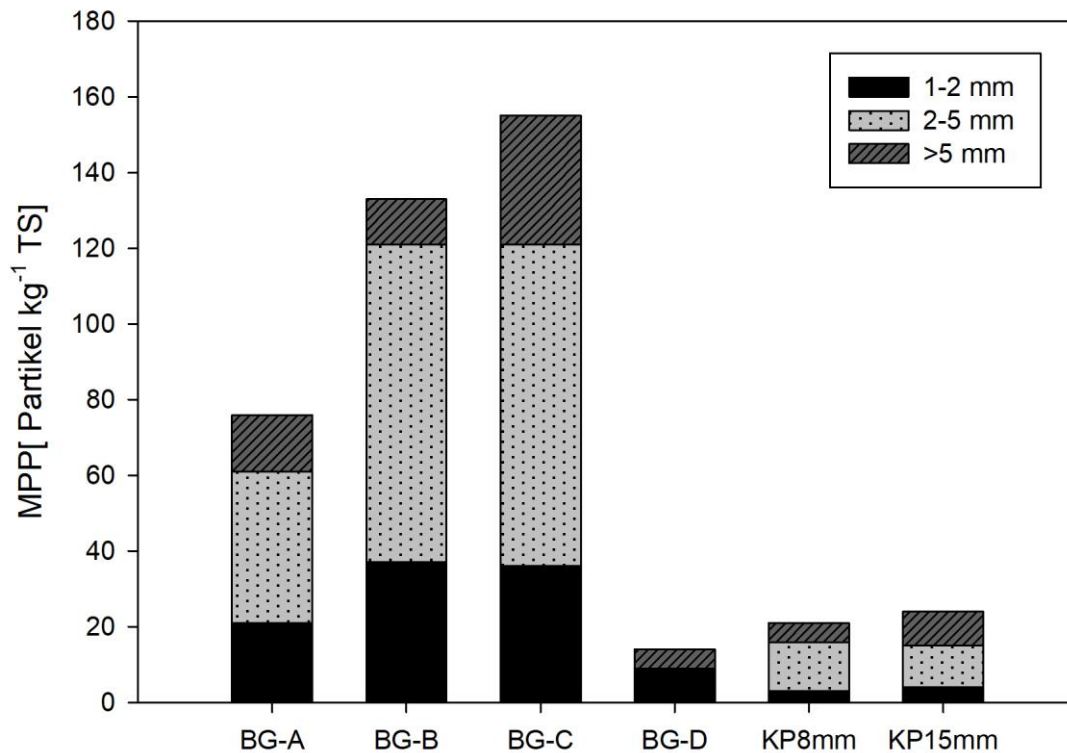


Abbildung 45: Größenfraktionen der MPP in Düngern aus der Bioabfallverwertung

BG A/B/C/D: BGA, KP 8mm/15mm: Kompostieranlage.

Die deutlich geringere MPP-Belastung in den KP-Proben kann mehrere Ursachen haben: Es findet eine Vorsortierung statt, bei der die Substratfraktionen > 80 mm zunächst getrennt untersucht und Störstoffe wie Kunststoffe entfernt werden. Hierdurch werden größere Kunststoffe entfernt, bevor diese im weiteren Prozess zu MPP zerfallen. Wie verschiedene Studien zeigten, haben äußere Bedingungen einen starken Einfluss auf die Abbaumechanismen und die Abbaubarkeit von Kunststoffen. Hierzu zählen Temperatur, Sauerstoff und UV-Strahlung sowie die Enzymaktivität und Enzymzusammensetzung in der Umgebung⁸⁸. Während bei der Kompostierung im Mietenkern Temperaturen bis zu 75°C auftreten, werden die meisten BGAs zwischen 45 und 55°C betrieben. Neben den niedrigeren Temperaturen fehlen zudem begünstigende Faktoren, die zu einem Abbau einiger Polymerarten beitragen, wie Sauerstoff und UV-Licht. Eine Studie, bei der über 500 Tage der Abbau von PE und PET in einer aktiven anaeroben Umgebung bei 50°C untersucht wurde, zeigte, dass praktisch kein Abbau stattfindet¹⁷⁰. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass PE- und PS-Partikel, die in allen bioabfallverwertenden Anlagen gefunden wurden, hoch resistent gegenüber Umweltbedingungen sind und nachdem sie erstmals in die Umwelt gelangen, über viele Jahre angereichert werden. Alleine in Deutschland wurden im Jahr 2015 rund 13 Millionen Tonnen

Biomüll entweder in Biogas oder Kompostanlagen vergoren ⁸. Dies entspricht ungefähr einer Menge von 5 Millionen Tonnen Kompost, die landwirtschaftlich oder zum Gartenbau verwendet werden. Die ermittelten Partikelzahlen >1 mm aus den Bioabfallverwertungsanlagen liegen zwischen 14 (BG-D) und 752 (FD) kg⁻¹ TS. Dies liegt deutlich im Rahmen der Düngemittelverordnung, die als Grenzwert für nichtabgebaute Kunststoffe 0,1 % Gew.-% TM für Kunststoffe über 1 mm Größe festlegt ¹⁷¹. Obwohl die ermittelten Werte nicht repräsentativ für alle Anlagen in Deutschland sind, kommt man bei einer Hochrechnung auf Belastungswerte zwischen 35 Milliarden und 1,9 Billion Partikeln a⁻¹ unter der Annahme, dass ein kg Kompost 50 % TS enthält. Vergleichswerte aus terrestrischen Systemen, die Belastungen von Ackerböden oder die Akkumulation von Plastikpartikeln in terrestrischen Systemen untersuchen, sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Die einzige Vergleichsmöglichkeit bietet Klärschlamm. Aufgrund einer Vielzahl von Giftstoffen, die im Klärschlamm vorkommen können, darunter z.B. hohe Schwermetallgehalte, darf dieser nur bedingt auf Feldern ausgebracht werden. Dennoch konnten in Klärschlamm vergleichsweise deutlich höhere Werte zwischen 1000 und 24000 MPP kg⁻¹ nachgewiesen werden ^{172,173}.

Bei den MPP in Klärschlamm handelt es sich Großteils um Primärplastik, der bereits als < 5 µm hergestellt wird und beispielsweise als Zusätze in Kosmetika Anwendung findet oder aus Polymerfasern durch Waschen von Textilien stammt. Während es möglich ist, das Ausmaß an primären Mikroplastikpartikeln, beispielsweise durch gesetzliche Regelungen, zu reduzieren, ist dies im Falle von kommunal gesammelten Bioabfällen vorrangig durch die Sensibilisierung der Verbraucher möglich.

Die Gefahren, die durch Mikroplastik, das in die Umwelt gelangt, ausgehen, werden kontrovers diskutiert. Die meisten Studien beziehen sich wiederum auf aquatische Systeme. Mögliche Gefahren, die auch auf terrestrische Systeme übertragbar sind, entstehen durch pathogene Mikroorganismen, die sich auf Plastikpartikeln ansiedeln und so neue Gebiete besiedeln ⁹¹. Zudem zeigen Studien, dass Mikroplastikpartikel beispielsweise von Zooplankton ¹⁷⁴ aufgenommen und über die Nahrungskette auch von anderen Meerestieren aufgenommen werden kann ⁸⁹. Farrell et al. wiesen auf trophischer Ebene eine Übertragung von Mikroplastik von Muscheln zu Krabben nach ¹⁷⁵. Es ist möglich, dass ähnliche Vorgänge auch an Land erfolgen ¹⁷⁶. Huerta Lwanga et al. mischten PE-Partikel mit Pflanzenstreu in den Verhältnissen 7; 28; 45 und 60 % und vermischten das Streu wiederum mit Boden sodass Gesamtkonzentrationen zwischen 0,2 1,2 % entstanden. Die so gefütterten Regenwürmer zeigten bei den Konzentrationen ab 28% im Streu, dass die Aufnahme der Partikel zu einer

erhöhten Sterblichkeitsrate und eingeschränktem Wachstum führte ¹⁷⁷. Eine weitere Studie zeigte, dass polybromierte Diphenylether (PBDE), die Kunststoffen als Flammschutz beigemischt werden, bioverfügbar sind und durch Verwitterungsprozesse in Böden übergehen. Dort werden sie von Regenwürmern aufgenommen. Zudem besteht die Möglichkeit einer Übertragung auf trophischer Ebene ¹⁷⁸. Es ist jedoch nicht erforscht, wie sich Additive bei der Vergärung und Kompostierung verhalten. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Stoffe von den Mikroorganismen ab- oder umgebaut werden.

Die Forschung befasst sich hauptsächlich mit MPP und deren Auswirkungen in Ozeanen ^{179,180}. Einige Studien untersuchen Süßgewässer (Flüsse und Seen) ¹⁸¹. Um eine verlässliche Gefahrenabschätzung auf terrestrische Systeme anstellen zu können, besteht weiterer Forschungsbedarf. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre zudem die direkte Auswirkung auf die Organismen und den Biogasprozess.

Aufgrund der sehr inhomogenen Struktur der Gärreste erscheint es kaum möglich, Gärreste von Verunreinigungen aus Mikroplastik zu befreien. Verschiedene Möglichkeiten zur Reduzierung von Störstoffen in Gärresten werden zwischenzeitlich angedacht. Die einfachste ist die Verbrennung der Gärreste, wie es bei Klärschlamm mit hohem Schwermetallgehalt gebräuchlich ist. Als weitere Methode kommt die Hydrothermale Carbonisierung (HTC) in Frage, eine Methode, bei der Biomasse in wässriger Suspension bei hohen Temperaturen (180 bis 250° C) und erhöhtem Druck zu HTC-Kohle umgewandelt wird. Die Kohle kann als Energieträger, zur Bodenverbesserung oder als Sorbens in der Abwasserreinigung verwendet werden ¹⁸². Zunächst sollten jedoch breitere Studien durchgeführt werden, um die Notwendigkeit solcher Verfahren zu evaluieren, da die Kompostdünger weitreichende Vorteile in vielen Bereichen aufzeigen. Neben der Substitution von artifiziellen Düngern und dem damit verbundenen Beitrag zur nachhaltigen Landwirtschaft sowie den finanziellen Einsparungen, tragen Kompostdüngern einen wichtigen Beitrag zur Pflanzengesundheit durch Vermeidung von biotischen und abiotischen Stressfaktoren bei. Sie erhöhen die Fruchtbarkeit, beugen pH-Stress vor, lockern die Bodenstruktur und sorgen für erhöhte Porosität und damit für eine verbesserte Wasserhaltekapazität ¹⁸³. Insbesondere die lockere Struktur und damit verbunden der höhere Sauerstoffeintrag führen zu deutlich höherer mikrobieller Biomasse in den kompostgedüngten Böden. Chaoui et al. zeigen, dass die Düngung mit Kompost nach 70 Tagen zu einer siebenfach höheren mikrobiellen Biomasse und einer 19-mal höheren Respirationsrate im Vergleich zur Düngung mit artifiziellen Düngern führt ¹⁸⁴. Durch Einbringen der intakten und hochaktiven Mikrobiologie etabliert sich ein effektiver Schutz für die Nutzpflanzen vor

Pflanzenpathogenen. Dies ist zum beispielsweise für *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* oder pathogenen *Pseudomonas*-Spezies, die zu einem hohen Anteil der Ernteaufälle beitragen, belegt¹⁸³. Als Antagonisten durch die Erhöhung der Enzymaktivität sowie den Verbrauch von verfügbaren Nährstoffen, die für die schädlichen Saprophyten essentiell sind, wird der Ausbreitung und dem Befall der Pflanzen durch Schadorganismen vorgebeugt^{183,185,186}. Dies führt zu höheren Erträgen und minimiert den Einsatz von Pestiziden. Diese ökologischen und ökonomischen Vorteile von organischem Dünger würden bei der thermischen Behandlung wegfallen. Daher sollten zunächst breitere Studien durchgeführt werden, auf deren Basis eine tiefgreifende Evaluierung stattfinden kann. Durch Sensibilisierung der Bevölkerung und strengere Auflagen für industrielle Entsorger kann eventuell bereits eine ausreichende Eindämmung der Mikroplastikproblematik erreicht werden.

4.7 Metall(oid)belastung im Gärprozess

Es wird vermutet, dass Metalloide, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen, durch das Gärsubstrat oder Gärhilfsmittel in BGAs gelangen. Wie Versuche mit Reinkulturen zeigen, werden die Arsenverbindungen von Archaeen und Bakterien methyliert¹²⁶. Hierfür werden im anaeroben Milieu eine Reihe verschiedener Methylendonatoren verwendet, wodurch Metalloidspezies entstehen, die teilweise flüchtig sind und in die Gasphase übergehen¹²². In der BGA treffen die Metalloide auf eine hochaktive mikrobielle Gemeinschaft, wodurch komplexe Reaktionen erwartet werden (s. Absatz 2.6.2).

Um die Auswirkungen auf den Prozess, die entstehenden Produkte sowie daraus resultierend auf die Weiterverwendung des Gases und Folgen für Mensch und Umwelt einschätzen zu können, wurden Versuche im Rahmen einer vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) geförderten, einjährigen Studie durchgeführt.

Zunächst wurden technische Anlagen auf ihren Metalloidgehalt im Gärsubstrat untersucht und dann für ausgewählte Anlagen Arsenspezifizierungen in Flüssig- und Gasphase durchgeführt. Hierfür wurde die flüssige Phase der technischen Anlage auf Laborsatelliten übertragen und verschiedene Arsenkonzentrationen zugesetzt. Ziel war es, die Bildung von Arsenspezies sowie die damit verbundenen Auswirkungen auf Mikrobiologie, Gasausbeute und Zusammensetzung des Gases sowie relevante Stoffwechselprodukte zu verfolgen.

4.7.1 Metalloide in technischen Anlagen

In allen Anlagen wurden Metalloide nachgewiesen (Abbildung 46). Mit Ausnahme von Se fanden sich die höchsten Konzentrationen in den KAs (14, 15). Hier war zudem ein Spektrum

sämtlicher untersuchter Metalloide vorhanden. Der höchste As-Wert fand sich in der KA Saale (Anlage 15) mit $20,6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ TS}$. Dieser wäre laut Düngemittelverordnung kennzeichnungspflichtig. Se dient dem Aufbau von Aminosäuren wie Selenocystein oder Selenomethionin, die von einigen Methanogenen zur Oxidation von H_2 benötigt werden und somit einen wachstumslimitierenden Faktor darstellen¹²⁰. Um eine Limitierung zu vermeiden, ist Se in kommerziellen Gärhilfsmitteln zugesetzt und wird so in die Anlagen eingetragen. Die Empfehlungswerte für Se betragen $0,2\text{-}2,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ TS}$ ¹²⁰ und werden in einigen Anlagen leicht, in Anlage 5 und 9 deutlich überschritten. Die Kennzeichnungspflicht für Düngemittel¹¹⁴ für Se von 0,0005 % wird jedoch in keiner der überprüften Anlagen erreicht. Bei den BGAs war der höchste As-Wert mit $2,9 \text{ mg kg}^{-1}$ in Anlage 3 zu finden. Sb wurde in keiner BGA in Konzentrationen über 1 mg kg^{-1} gefunden, Bi nur in Anlage 9 mit einer Konzentration von $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ erreicht. Für beide Elemente bestehen keine vorgeschriebenen Richtwerte. Zusätzlich wurden 15 weitere Elemente quantifiziert. Eine Übersicht ist in Tabelle A 13 im Anhang zu finden.

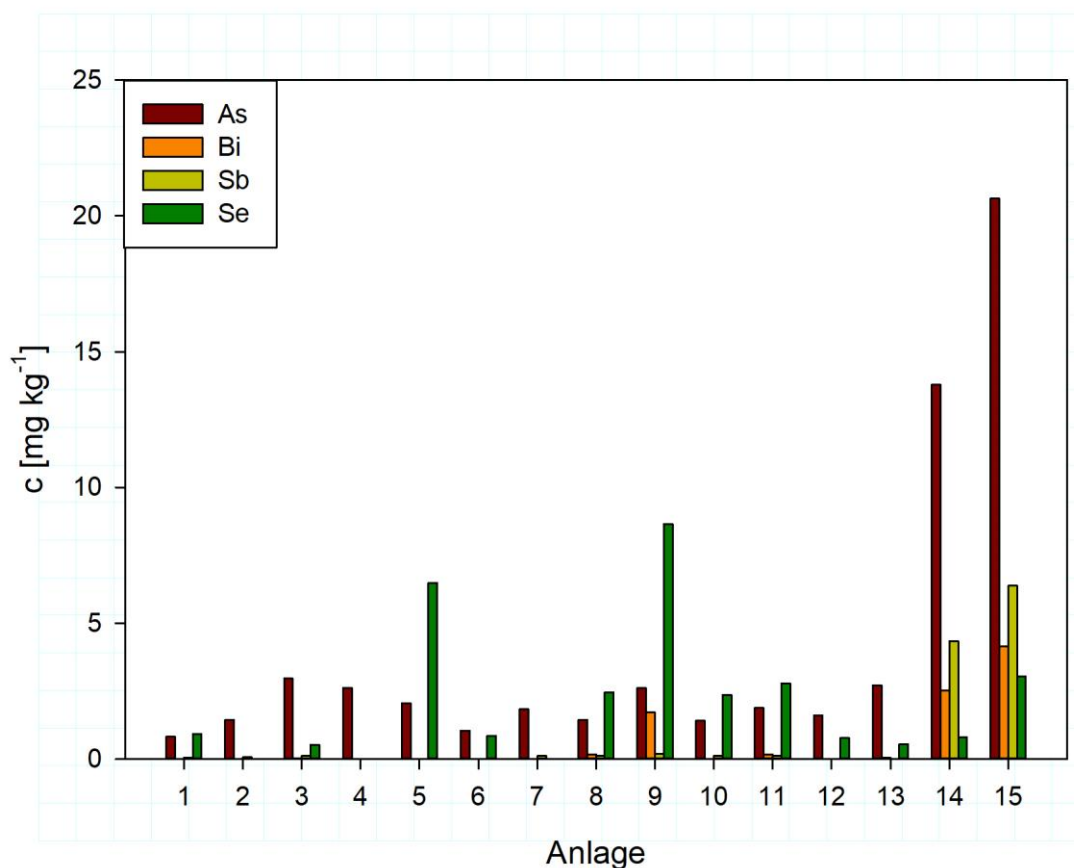


Abbildung 46: Metalloid-Konzentrationen in den technischen Anlagen

Dargestellt sind die As-, Bi-, Sb- und Se-Konzentrationen in den beprobten Biogasanlagen (1-13) und den KAs (14,15).

4.7.2 Speziierung in Flüssig- und Gasphasen technischer Anlagen

Im Vergleich zur Bestimmung des Gesamtgehaltes ist die Arsenspeziiierung sehr aufwändig (s. Kapitel 3.11.2 und 3.12) und wurde daher vollumfänglich nur an vier ausgewählten Anlagen durchgeführt: Drei BGAs Anlage 1, Anlage 5, Anlage 7, sowie zusätzlich bei der KA (Anlage 14). Die Anlagen wurden aufgrund der bei den Gesamtbestimmungen ermittelten Metall(oid)-konzentrationen ausgewählt. Anlage 1 wurde aufgrund geringer, Anlage 5 und 7 aufgrund erhöhter und Anlage 14 (KA) aufgrund hoher Belastung herangezogen.

Während in Anlage 1 As (III) und MMA (V) und in Anlage 5 ausschließlich As (III) in vergleichsweise geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, befanden sich in der flüssigen Phase von Anlage 7 mit As(III), DMA(V), MMA(V) und As(V), alle untersuchten Spezies (Abbildung 47). Den größten Anteil machten ungefähr zu gleichen Teilen As (III) und MMA (V) in Konzentrationen von 0,17 und 0,16 mg kg⁻¹ aus. In der KA wurden die höchsten Konzentrationen nachgewiesen. Die höchste war TMA (V) mit 2,05 mg kg⁻¹, gefolgt von MMA (V) mit 0,75 mg kg⁻¹ und As (III) mit kg⁻¹, während kein DMA nachgewiesen werden konnte.

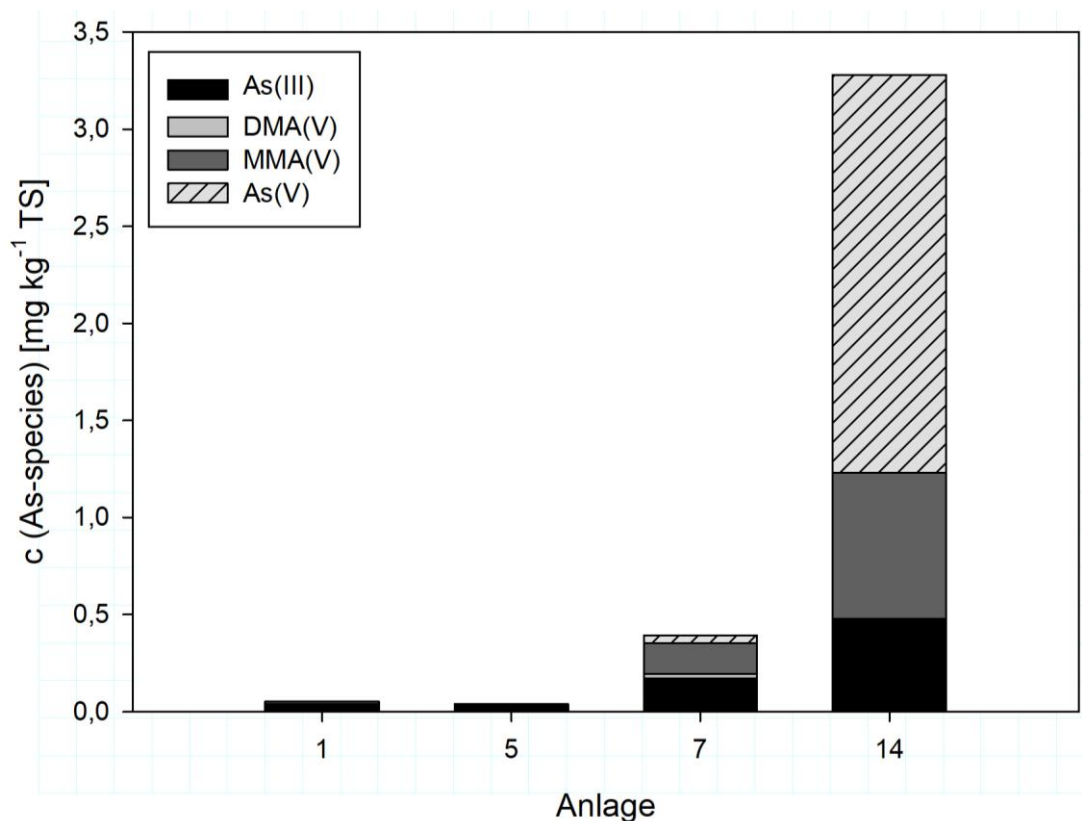


Abbildung 47: Metall(oid)-Konzentrationen in den Flüssigphasen technischer Anlagen

As-Spezies aus den Flüssigphasen der BGAs (1, 5, 7) sowie der KA (14). Die Zuordnungen und eingesetzten Substrate sind aus Tabelle 8 ersichtlich.

Volatile As-Spezies können unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart von organischer Substanzen vor allem in vier Hauptarten gebildet werden: Arsin (AsH_3) sowie MMA, DMA und TMA ($\text{AsH}_2(\text{CH}_3)$, $\text{AsH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{As}(\text{CH}_3)_3$). In der KA wurden die größten Mengen an volatilen As-Spezies gefunden, gefolgt von Anlage 7 und der Anlage 5. In Anlage 1 wurden keine volatilen As-Spezies nachgewiesen. Das hoch toxische Arsin AsH_3 war die dominierende Verbindung in der KA Bayreuth (16 ng m^{-3}), während TMA(III) in den Anlagen 7 und 5 dominiert (16 bzw. 4 ng m^{-3}) (Abbildung 48). Bezogen auf das gesamte gemessene As aus den Flüssigphasen wird in den untersuchten BGAs 5 und 7 (As-Gesamt: $2,1$ und $1,8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ TS}$, s. Abbildung 46) ein deutlich größerer Anteil volatilisiert als in der Kläranlage (As-Gesamt: $13,8 \text{ mg kg}^{-1}$).

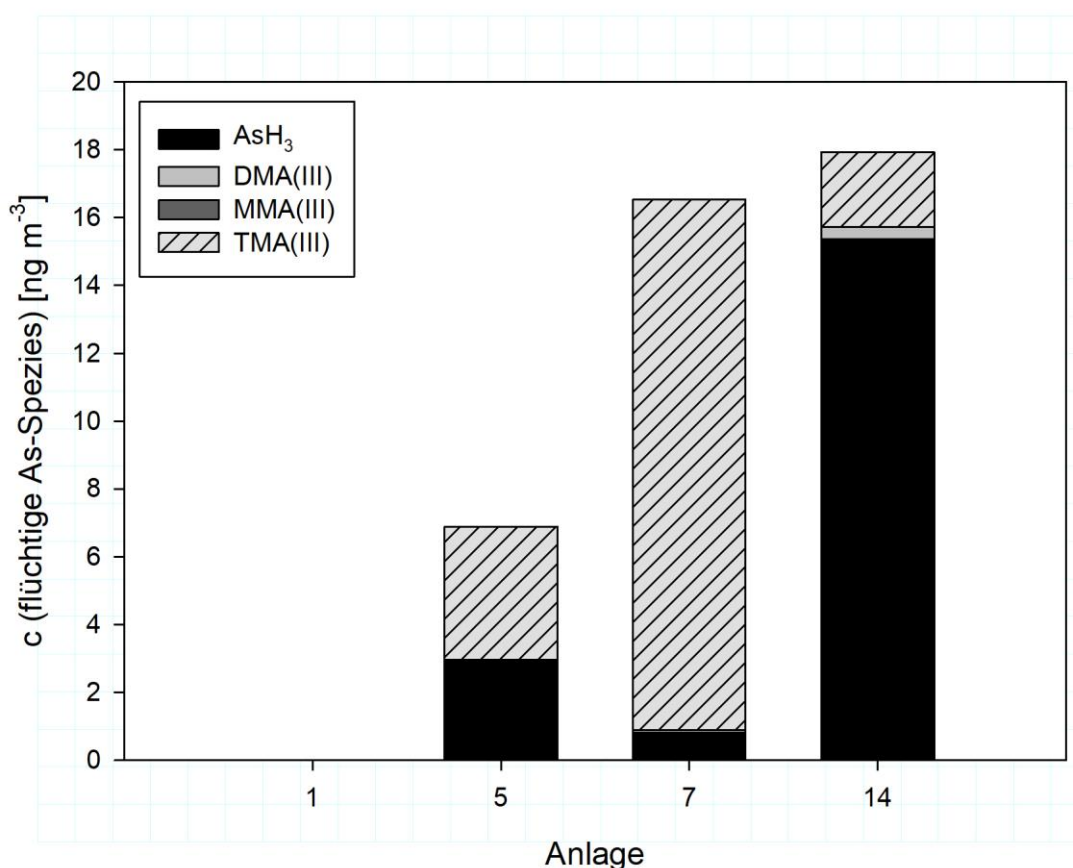


Abbildung 48: Metall(oid)-Konzentrationen in den Gasphasen technischer Anlagen

As-Spezies aus den Gasphasen der BGAs (1, 5, 7) sowie einer KA (14). Die Zuordnungen und eingesetzten Substrate sind aus Tabelle 8 ersichtlich.

Obwohl sich das in den Anlagen gemessene Gesamt-As unterhalb der vorgegebenen Grenzwerte befindet, konnten in den Flüssigphasen aller Anlagen sowie in den Gasphasen dreier Anlagen Arsenspezies nachgewiesen werden, die auf metabolische Aktivitäten

zurückzuführen sind. Es ist zudem davon auszugehen, dass möglicherweise toxische methylierte As-Spezies, aufgrund ihrer Instabilität gegenüber Sauerstoff zerfallen oder von Pflanzen aufgenommen werden ¹¹⁶.

Die festgestellten Konzentrationen in den flüssigen Phasen der BGAs liegen im Bereich der durchschnittlichen As-Konzentration in unbelasteten Böden und sind somit als Dünger unbedenklich. Eine Ursache für die geringen Belastungen kann die Beschränkung der untersuchten Anlagen auf einen limitierten geografischen Raum und auf Anlagen aus dem landwirtschaftlichen Sektor sein. Denkbare Faktoren, die zu höheren Konzentrationen führen können, sind kontaminierte Substrate (z.B. industrielle Abfälle) oder die Verwendung von Rohstoffen aus stärker belasteten geografischen Regionen. Hierzu zählen Anreicherungen durch die Vergärung von Abfällen aus importiertem Geflügel- oder Schweinefleisch, das durch As-haltige Futterzusätze kontaminiert ist ^{187–189}, oder naturgemäß höher belasteter Fisch und Meeresfrüchte ^{190,191}. Zudem hängt die Arsenbelastung von der vorherrschenden Bodenart einer Region ab. Die höchsten natürlichen Werte finden sich meist in Mooren und Sumpfgebieten. In Regionen Bayerns wurden Werte von bis zu 156 mg kg⁻¹ TS (ca. 30 x Durchschnittswert unkontaminierter Böden) in als Ackerböden und Grünland genutzten Flächen nachgewiesen ¹⁰⁹. Die Aufnahme in Pflanzen erfolgt aus den Böden ¹¹⁵. In oxischen Böden, wo Arsen hauptsächlich als Arsenat vorliegt, wird dieses von Pflanzen über die Phosphataufnahmekanäle aufgenommen und akkumuliert. Spezifische Studien belegen die As-Aufnahme durch häufig verwendete Gärsubstrate wie Gerste ¹¹⁷, Gräser ^{66,192} und Maispflanzen ^{118,119}, die einen direkten Eintragsweg in BGAs darstellen.

Während sich die vorliegende Arbeit auf die Quantifizierung von As-Spezies beschränkt, gilt die biologische Umwandlung weiterer Metalloide u.a. für methanogene Reinkulturen (Thomas et al. 2011), für Mischkulturen aus anaeroben Böden ¹⁹³, anaerobe Abbauprozesse ¹²² und aquatische Systeme ¹⁹⁴ als erwiesen. Es wurde zudem gezeigt, dass wie bei der As-Methylierung neben einer Reihe anderer Verbindungen SAM (s. Absatz 2.6.2) als Methylondonator fungiert ¹²². Es kann davon ausgegangen werden, dass in den untersuchten Anlagen, sofern vorhanden, auch die Methylierung und Hydrierung weiterer Metall(oid)e stattfinden. Bei der Untersuchung der Toxizität verschiedener typischer, biochemisch transformierter und volatiler Spezies von As, Bi, Zinn (Sn) und Quecksilber (Hg) auf Säugetierzellen (CaCo, CHO-9, HepG2) zeigte sich, dass die getesteten Spezies von As, Bi und Hg auf alle Zelllinien toxisch wirkten ¹⁹⁵.

Aufgrund vieler unbekannter Faktoren ist es jedoch nicht möglich, aus den erhaltenen Kenntnissen der Untersuchungen an den technischen Anlagen Rückschlüsse über die Auswirkung des Arsens auf Biologie und Gasqualität zu erhalten. Da auch im pflanzlichen Stoffwechsel As methyliert wird, ist keine Aussage über die Herkunft der detektierten Spezies möglich. Um die unmittelbar von den MO gebildeten Spezies sowie die Auswirkungen auf den Prozess zu verfolgen, wurden im Anschluss biologische Systeme auf Laborsatelliten übertragen und dort gezielt As zugesetzt.

4.7.3 Performance der Biogassatelliten in Abhängigkeit von der As-Konzentration

Als wichtige Ergänzung der Untersuchungen an den technischen Anlagen wurden Reaktorproben aus den technischen Anlagen entnommen und auf den Labormaßstab übertragen. Hierbei wurde eine schnelle Überführung ohne O₂-Eintrag und gleichbleibende Temperatur sichergestellt, um den Prozess möglichst nicht zu beeinflussen. Es wurden sechs Laboransätze (Satellitenreaktoren) betrieben und in Duplikaten verschiedene As-Konzentrationen 24 h nach Reaktorstart zugesetzt. *Ansatz 0 a, b* wurde kein As zugesetzt, *Ansatz 1 a, b* wurden 30 µM und *Ansatz 2 a, b* wurden 60 µM zugesetzt. Eine genaue Beschreibung der Reaktoren und Versuchsdurchführung findet sich in Kapitel 3.5.3.

Die produzierten Gasvolumina t⁻¹ sowie die Methangehalte der Satelliten sind in Abbildung 49 dargestellt. Die Trends der unabhängigen Replikatreaktoren (a + b) zeigen deutliche Übereinstimmungen. Abweichungen bei den Einzelwerten wurden erwartet, da es sich um komplexe biologische Systeme handelt. Zu Beginn des Versuchs liegt in allen Reaktoren eine Gasproduktion zwischen 11,5 und 15,0 mL h⁻¹ vor. Mit Anstieg des CH₄-Gehalts nimmt das produzierte Gasvolumen ab. Dieses Verhalten ist in neu gestarteten Reaktoren üblich, da sich Gas aus dem Kopfraum bei Erwärmung ausdehnt und somit ein Überdruck entsteht. Die As-Gabe nach 24 h wirkt sich sichtbar auf die Produktion aus und steht im direkten Zusammenhang mit der As-Konzentration. In den unbelasteten Reaktoren werden nach drei Tagen 6-8 mL, in den mittelbelasteten Reaktoren 4-5 mL und in den stark belasteten nur mehr 1,5 mL produziert. *1a* und *1b* steigern ihre Gasproduktion bis zum nächsten Messpunkt wieder und pendeln sich im Laufe des Versuchs in ähnlichen Größenordnungen wie die unbelasteten Satelliten ein. *2a* und *2b* zeigen zwischen Tag 3 und Tag 6 keine Steigerung der Produktion, zwischen Tag 6 und Tag 13 konnte eine Erholung festgestellt werden. *2a* zeigt einen sprunghaften Anstieg zwischen Tag 13 und 14, und eine weitere Steigerung zwischen Tag 14 und 17. Die Abweichungen des prozentualen CH₄-Gehalts sind kaum festzustellen. An zwei Stellen musste in *Ansatz 2b* auf eine CH₄-Bestimmung verzichtet werden, da nicht genug Gas für eine verlässliche Bestimmung

produziert wurde. Reaktor 2a zeigt gegen Ende der Versuchsdauer, parallel zur Zunahme der Gasproduktionsrate, einen Anstieg des CH₄-Gerhalts auf 54 %. Dies spricht dafür, dass in diesem Reaktor die anfängliche Beeinträchtigung durch das zugesetzte As überwunden wurde. Die prozentuale Menge an CH₄ bleibt während des Rückgangs des Gasvolumens nahezu konstant. Dennoch geht die effektiv produzierte Menge an CH₄ deutlich zurück, was ebenfalls auf eine Hemmung abhängig vom As-Gehalt schließen lässt.

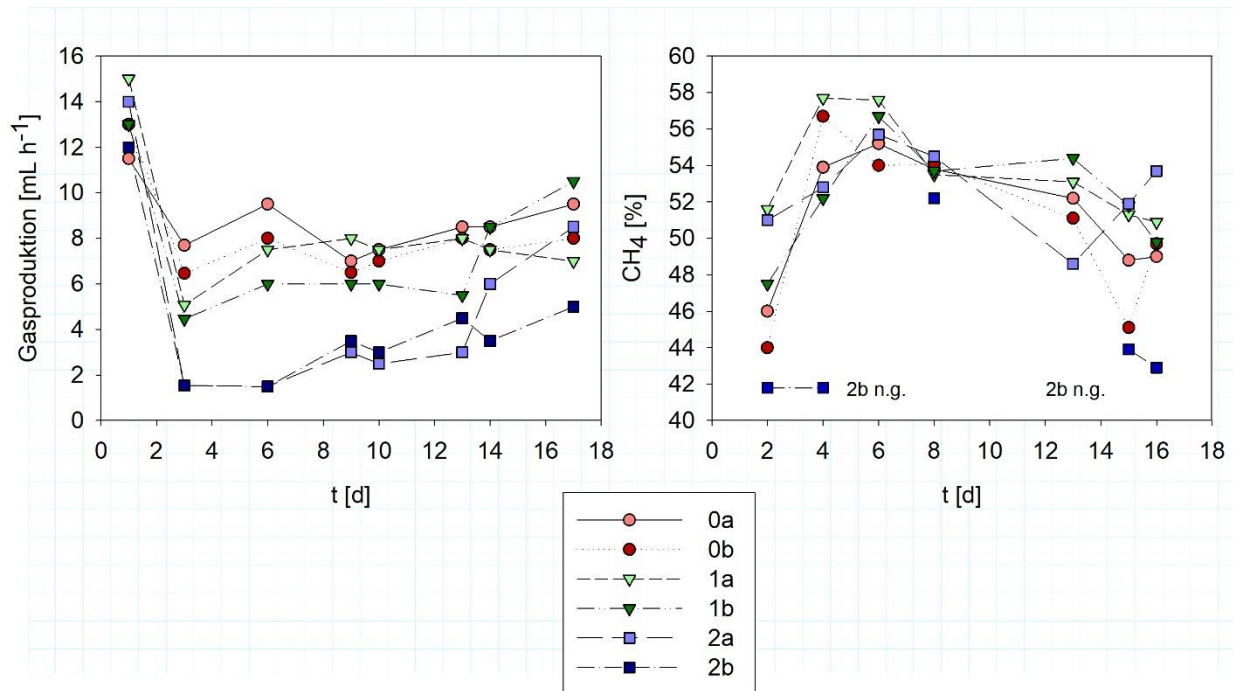


Abbildung 49: Gasproduktion und CH₄-Gehalt der Satellitenreaktoren

Links ist die Gasproduktion, rechts der CH₄-Gehalt dargestellt. Die Bezifferung 0-2 bezeichnet die verschiedenen belasteten Reaktoren, a und b bezeichnet die unabhängigen Vergleichsreaktoren.

Essigsäure, die als Produkt der Acetogenese am Ende einer Reihe bakterieller Abbauprozesse gebildet wird und durch acetoklastische Archaeen im Methanbildungsprozess verbraucht wird, ist ein wichtiger Indikator für einen funktionierenden Prozess. In den unbelasteten Reaktoren 0a, b, sinkt die Essigsäure-Konzentration über die Zeit, in 1a ebenfalls, in 1b ist eine geringfügige Zunahme um 0,1 mmol L⁻¹ zu beobachten (Tabelle 30). In den am höchsten belasteten Reaktoren steigt die Konzentration hingegen deutlich an. Die Akkumulation ist in 2b am höchsten mit 9,32 mmol L⁻¹. In 2a ist die Konzentration geringer und beträgt 5,69 mmol L⁻¹. Die Anreicherung von Essigsäure belegt eine Störung des Prozesses durch die Zugabe hoher As-Konzentrationen. In Reaktor 2a könnte die Akkumulation zwischen den Probennahmen höher gewesen sein und gegen Ende abgenommen haben. Hierfür spricht die bereits erwähnte Zunahme von Gasproduktion und CH₄-Gehalt gegen Ende des Versuchs.

Tabelle 30: Essigsäurekonzentrationen in den Satellitenreaktoren

Tag	0a [mM]	0b [mM]	1a [mM]	1b [mM]	2a [mM]	2b [mM]
0	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39
16	2,80	LDL	2,7	3,49	5,69	9,32

Die gemessenen Prozessparameter ergeben ein Gesamtbild, das auf die Hemmung der Reaktorperformance durch As hinweist. Die Auswirkungen scheinen abhängig von der Konzentration und zudem reversibel zu sein. Die Anreicherung von Essigsäure lässt auf eine Hemmung der acetoklastischen Methanogenen schließen. Diese kann sowohl durch die Hemmung aufgrund bestimmter As-Spezies, als auch durch die Methylierung von As in Konkurrenz zur CH₄-Produktion hervorgerufen werden.

Basierend auf den Versuchen zur Anlaufphase (Kapitel 4.3), in der sich zeigte, dass eine veränderte Substratgabe zu einer Reihe von Änderungen betreffend der Mikrobiologie, der CH₄-Produktion sowie des Fettsäure-Gehalts führt, wurde auf eine Nährstoffgabe während der Versuchszeit verzichtet, da mögliche Änderungen im Prozess weitest möglich dem As zugeordnet werden sollten. Aufgrund der Instabilität vieler As-Spezies gegen O₂ war eine Zufütterung mit unbehandeltem Substrat aus der technischen Anlage, unter anderem aufgrund des Feststoffgehalts, nicht durchführbar. Die Zugabe einer für den Prozess untypischer C-Quelle wie Glucose oder aufgeschlossenem Substrat wäre hingegen mit unvorhersehbaren Effekten, wie erhöhter Wachstumsrate bestimmter Bakterien und steigender CO₂-Konzentration im Gas einhergegangen. Versuche in Böden zeigten zudem, dass die Zugabe von Glucose die As-Laugungskapazität steigert ¹⁹⁶.

4.7.4 Mikrobielle Dynamik der Satellitenreaktoren

Um einen Zusammenhang zwischen der Performance und mikrobieller Dynamik herzustellen, wurde eine ARISA-Analyse durchgeführt. Es wurde hierbei jeweils die Ausgangsprobe sowie der Zustand in den unterschiedlich belasteten Satelliten nach 15 Tagen Laufzeit analysiert. Die relative Abundanz der bakteriellen ARISA-Fragmente > 3 % zeigt kaum Veränderungen zwischen Start und Ende, unabhängig von der As-Belastung (Abbildung 50). Die Fragmentzusammensetzung der Archaeen ändert sich deutlich in Bezug auf die anfängliche Zusammensetzung. Die unterschiedlich belasteten Ansätze gleichen sich jedoch deutlich an. Dies deutet auf eine Änderung der Gemeinschaft hin, die nicht durch die As-Belastung, sondern durch den Übertrag in die Satellitenreaktoren erfolgt. Wie in Kapitel 4.7.3 gezeigt, hat die As-

Konzentration in den Satellitenansätzen deutlichen Einfluss auf die Reaktorparameter und führte zu einem Einbruch des produzierten Gasvolumens und zur Akkumulation von Essigsäure. Beides sind deutliche Indikatoren für Störungen der mikrobiellen Gemeinschaft. Aus den marginalen Änderungen der Fragmentzusammensetzung lässt sich schließen, dass die Zugabe von As, zumindest in den erfolgten Mengen, keine zytotoxische, sondern eine hemmende Wirkung auf die Mikroben hat. Diese Beobachtung ist hinsichtlich verschiedener Studien, die zeigen, dass Mikroorganismen durchaus höhere Konzentrationen aushalten können, plausibel. Wie Guan et al. zeigen, verfügen einige Organismen über Membrantransportproteine wie ArsB oder ACR3, über die toxisches As(III) aus den Zellen befördert wird ¹⁹⁷. Alaniz-Andrade et al. zeigten, dass Mikroorganismen der Gattungen *Bacillus*, *Micrococcus* und *Acinetobacter* eine Toleranz für Konzentrationen von 4 bis 25 mM Arsenit entwickeln können ¹⁹⁸. Fotidis et al. setzten Ammoniak als prozesshemmenden Stoff ein und zeigten, dass bei spontaner Exposition einer hohen Dosis zum Shift in der mikrobiellen Gemeinschaft führt, in der besonders resistente Organismen prozessbestimmend werden ⁴⁵. Ein ähnliches Verhalten wäre bei längerer Versuchsdauer, zumindest in den Ansätzen 2, ebenfalls zu erwarten gewesen. Langzeitstudien könnten Ergebnisse liefern, welche Organismen in dauerhaft höherbelasteten Anlagen zu erwarten sind.

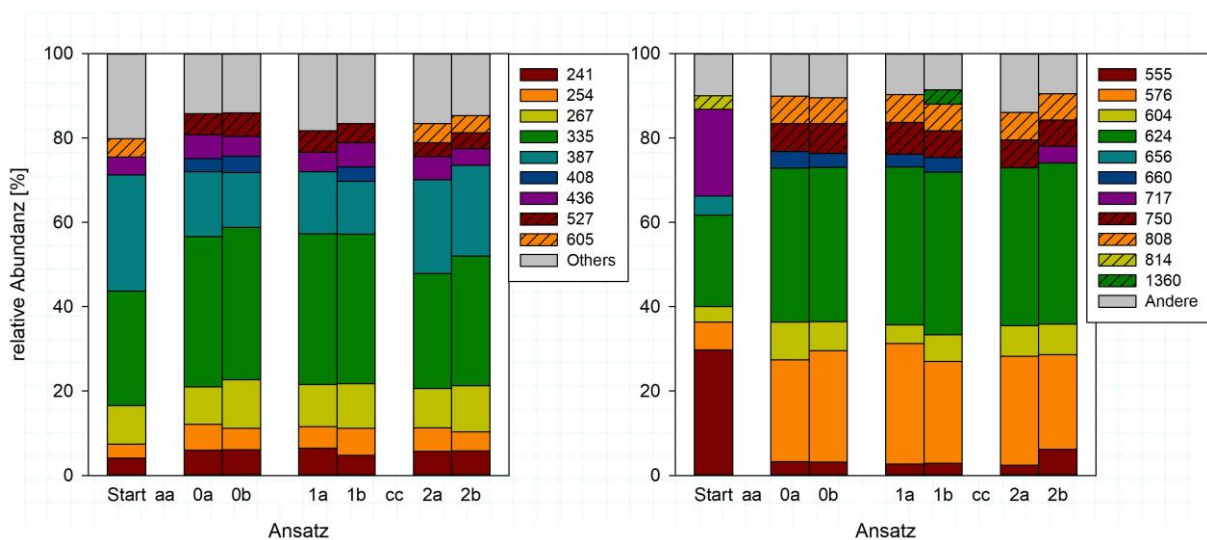


Abbildung 50: Relative Abundanz der ARISA-Fragmente in den Satellitenreaktoren

Es ist jeweils die relative Abundanz der Bakterien- (links) und der Archaeengemeinschaft (rechts) zum Anfang des Experiments (Start) und nach 15 Tagen dargestellt. Es sind nur Fragmente aufgezeigt, die > 3 % der Gesamtabundanz ausmachen. Die x-Achse zeigt die Replikate aus unabhängigen Reaktoren (a, b) der unterschiedlich mit NaAsO₂ belasteten Ansätze (0, 1, 2).

4.7.5 Speziierung in Flüssig- und Gasphasen der Satellitenreaktoren

Die folgenden Untersuchungen in Flüssig- und Gasphase sollten den Zusammenhang zwischen As-Spezies und der Prozesshemmung untersuchen. Die Untersuchung der Flüssigphase (Abbildung 51) zeigt vergleichbare Trends zwischen den unabhängigen Replikaten. In *0a* und *b* wurden keine Spezies quantifiziert. Obwohl As in der für anoxische Umgebungen typischen As(III)-Form zugegeben wurde, konnte in den Ansätzen *1* und *2* bereits zum Zeitpunkt der ersten Probennahme kein As(III) mehr nachgewiesen werden. In diesem Zeitraum fanden mehrere Reaktionen statt: In der flüssigen Phase die Oxidation des vorhandenen As(III) zu As(V) sowie die Methylierung zu MMA. In der Gasphase konnte AsH₃ sowie flüchtiges MMA nachgewiesen werden (Abbildung 52). Da die Toxizität der As-Verbindungen stark von der vorliegenden Spezies und organischen bzw. anorganischen Bindung abhängt, kann die Umwandlung eventuell als Abwehrmechanismus gegen toxische Verbindungen erfolgt sein¹²². Es sind jedoch auch Mechanismen bekannt, mittels derer chemoautotrophe Organismen durch die Oxidation von As(III) zu As(V) Energie gewinnen^{199,200}.

Im weiteren Verlauf nimmt das anfangs gebildete As(V) in den Ansätzen *1* und *2* über die Versuchsdauer wieder ab, während die MMA-Konzentration stetig zunimmt. Ab 7 Tagen nach Beginn wird zudem in allen Reaktoren DMA, in *1a* und *1b* in größeren Mengen, gebildet. In Reaktor *1b* übersteigt die Menge an gebildetem DMA die Konzentration an MMA nach 15 Tagen. As (III) wird in allen Reaktoren erst ab Tag 7 in vergleichsweise geringen Konzentrationen gebildet.

Der in Kapitel 4.7.3 aufgezeigte Rückgang der Gasbildung in den zusätzlich belasteten Reaktoren geht mit den hohen As(V)-Konzentrationen einher. Im Verlauf nimmt die As(V)-Konzentration ab, MMA nimmt zu und die Gasbildung erholt sich. Diese Entwicklung widerspricht den Erwartungen, da As(III) Spezies im Allgemeinen als toxischer gelten. McBride und Wolfe untersuchten anhand eines zellfreien *Methanobacterium*-Extrakts die biochemische CH₄-Synthese unter Zugabe von As(V)²⁰¹. Sie konnten einen konzentrationsabhängigen Rückgang der CH₄-Produktion nachweisen. Bei *Methanobacterium* handelt es sich um hydrogenotrophe Archaeen, die CH₄ hauptsächlich aus der Reduktion von CO₂ mit H₂ generieren. Die gezeigte Akkumulation von Essigsäure spricht für eine Hemmung der acetoklastischen Methanogenese durch das As(V).

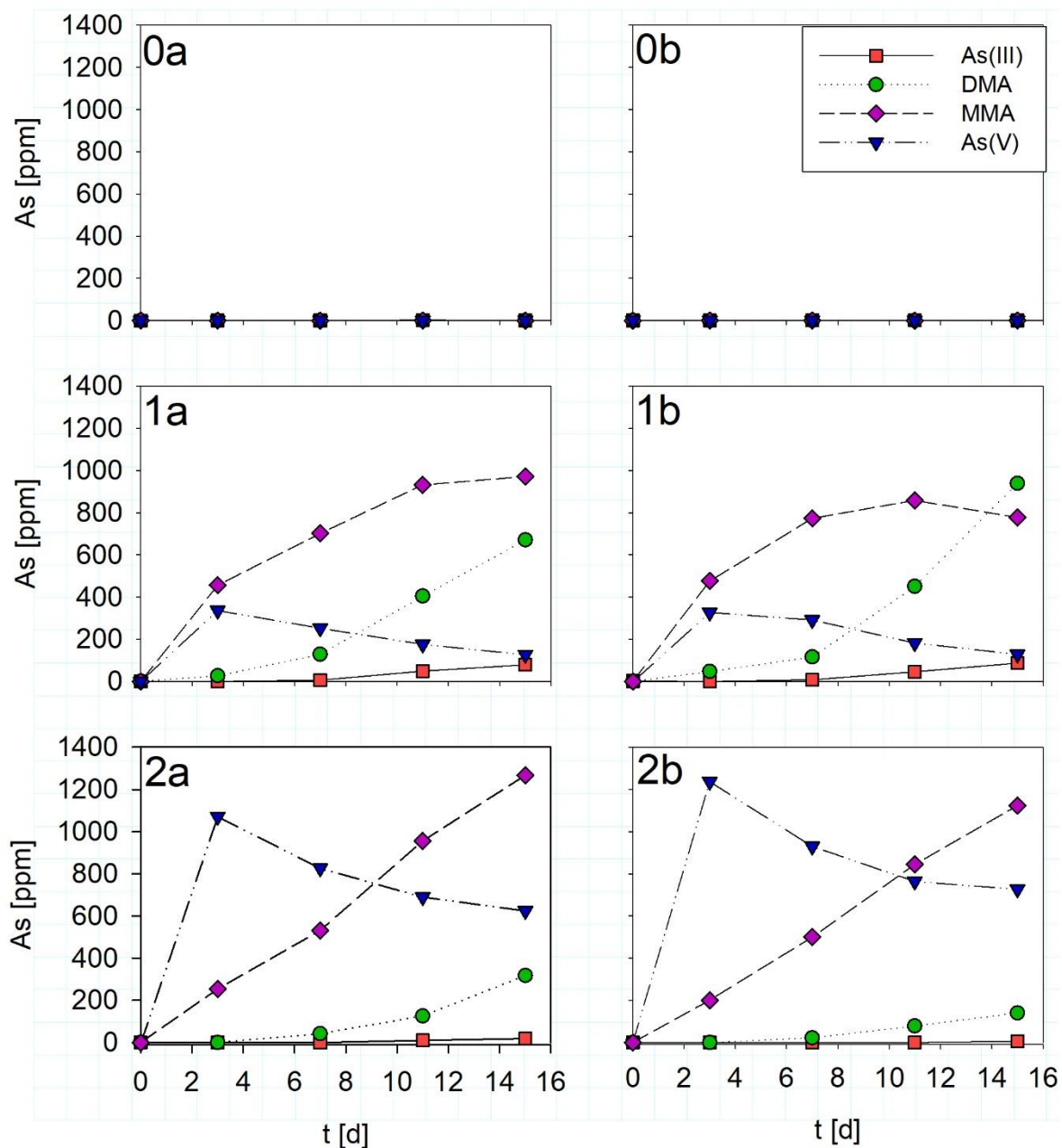


Abbildung 51: As-Spezies in den Flüssigphasen der Satellitenreaktoren

Es sind die Replikate aus unabhängigen Reaktoren (a, b) der unterschiedlich mit NaAsO_2 belasteten Ansätze (0 = unbelastet; 1 \triangleq 30 μM As; 2 \triangleq 60 μM As) dargestellt.

In der Gasphase steigt die Konzentration zwischen Messpunkt eins (3 Tage) und zwei (7 Tage) zunächst in allen Reaktoren an und nimmt zu Ende des Versuchs wieder ab (Abbildung 52). Es konnten nur AsH_3 und MMA(III) nachgewiesen werden. DMA(III) und TMA(III) , auf die ebenfalls untersucht wurde, wurden in keinem Reaktor nachgewiesen.

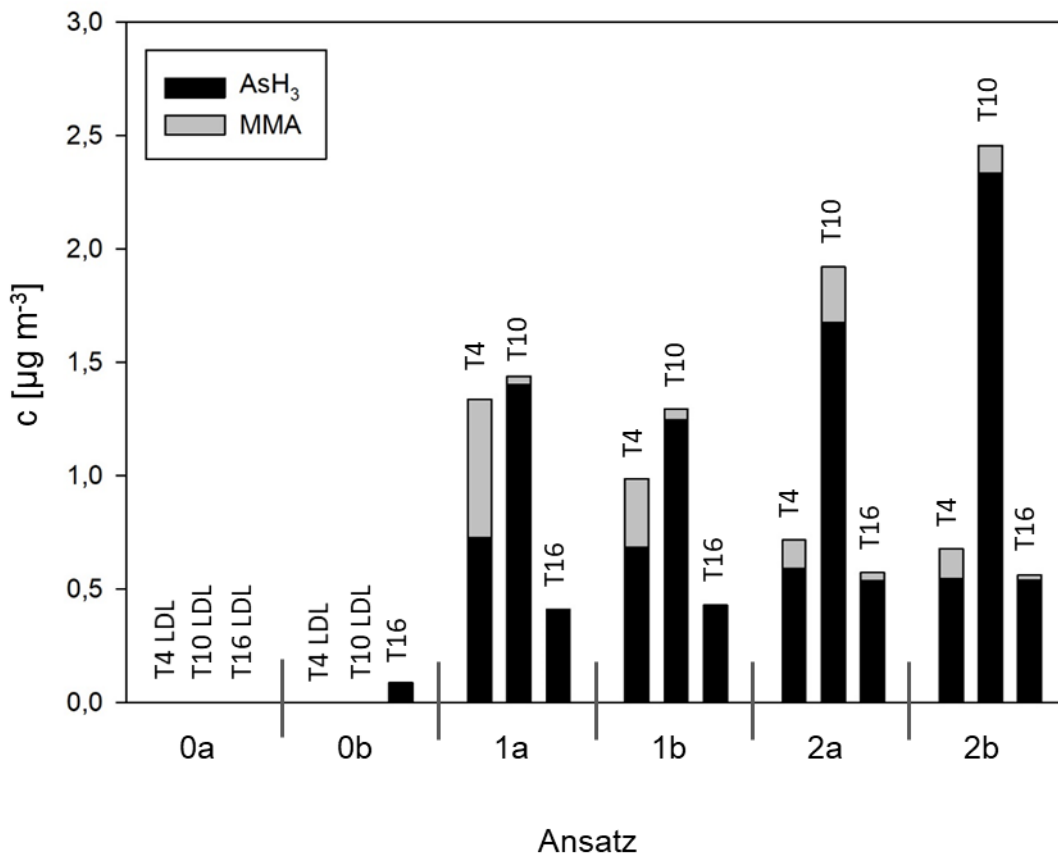


Abbildung 52: As-Spezies in der Gasphase der Biogassatelliten

Es sind die As-Spezies AsH₃ und MMA dargestellt, die in den jeweiligen Proben zum Versuchsstart (T0) und an den Tagen Tag 4 (T4), 10 (T10) und 16 (T16) in den unterschiedlich mit As belasteten Satelliten (0 \triangleq unbelastet; 1 \triangleq 30 μ M As; 2 \triangleq 60 μ M As) gefunden wurden. Es wurden keine DMA- und TMA-Spezies detektiert. Konzentrationen, die sich unterhalb der Detektionsgrenze befanden, sind als LDL gekennzeichnet.

Mestrot et al. untersuchten die Bildung volatiler As-Verbindungen in der Gasphase von Anaerob-Reaktoren nach der Zugabe von As in Form von MMA(V), Roxarson (C₆H₆AsNO₆) und As(V), jeweils in Konzentrationen von 1 mg kg⁻¹ ²⁰². Die Autoren stellen die Vermutung an, dass der limitierende Schritt der Volatilisierung die Bildung von MMA ist, da im Ansatz mit MMA-Zugabe die höchsten Konzentrationen methylierter Verbindungen im Gas erreicht wurde. Diese Beobachtung wird durch vorliegende Daten nicht bestätigt. Trotz stetiger Anreicherung von MMA in der flüssigen Phase wird als Hauptkomponente unmethyliertes AsH₃ in der Gasphase gefunden. Da die beteiligten Mikroorganismen einen erheblichen Einfluss auf die vorliegenden Spezies nehmen, kann ein abweichendes Konsortium zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Hierfür sprechen auch die Unterschiede der Verhältnisse von AsH₃ zu TMA der technischen BGAs in Kapitel 4.7.2.

In der Literatur finden sich Vorgänge, die zu unterschiedlichen Bildungsverhältnissen führen können. Eine wichtige Rolle spielen Mechanismen der mikrobiellen Methylierung, abweichende Vorgänge und ergänzende Methylierungen in Mischkonsortien, sowie die Substratzusammensetzung.

Yuan et al. zeigten, dass bakterielle Kulturen, die die Gene *asrsM* oder *ArsMC2* aufweisen, gleichzeitig AsH₃, MMA, DMA und TMA volatilisieren²⁰³. Ein *Arsenicibacter-rosnii*-Stamm, der aus As-kontaminiertem Boden extrahiert wurde, verfügt über die Möglichkeit mittels Arsenit-Methyltransferase hocheffizient As(III) zu DMA(V), TMA(V) und flüchtigem TMA(III) umzusetzen, ohne hierbei AsH₃ oder MMA freizusetzen²⁰⁴. Obwohl einige Studien zur Aufklärung von Mechanismen in einzelnen Organismen existieren, ist es aufgrund der Komplexität nicht möglich, die Schlüsselrollen einzelner Organismen in Mischkonsortien festzustellen. Reid et al. zeigten in einem speziellen Versuchsaufbau, der eine genaue Bilanzierung ermöglicht, eine hohe Methylierungseffizienz von 63 % des vorhandenen As durch ein Mischkonsortium²⁰⁵. Für Reinkulturen von *Methanosarcina acetivorans* und *Clostridium* sp. BXM wurden deutlich geringere Effizienten von 10 bis 13 % aufgezeigt^{206,207}. Zudem wird vermutet, dass neben den Mikroorganismen auch die Substratzusammensetzung eine entscheidende Rolle bei der As-Methylierung spielt^{196,208}.

Die Bildung volatiler Verbindungen, die anschließend in die Gasphase übergehen, stellt für einige Mikroorganismen eine Möglichkeit dar, sich vor toxischen Konzentrationen in ihrem Habitat zu schützen. Dies kann eine Gefährdung für Mensch und Umwelt darstellen, da vor allem trivalente As-Spezies als genotoxisch eingestuft werden²⁰⁹. Die Untersuchungen von Kligermann et al. zeigen, dass MMA(III) und DMA(III) deutlich toxischer sind als ihre As(V)-Äquivalente. Die As(III)-Spezies erwiesen sich in vitro 50 bis 430 x genotoxischer als anorganisches As und führten bei den exponierten Zellen um den Faktor 10³ häufiger zu Chromosomenmutationen als ihre As(V)-Äquivalente²¹⁰. Als hauptsächliche As-Spezies im Gas entsteht in den Experimenten das als hochgiftig eingestufte AsH₃. AsH₃ weist eine ausgeprägte hämatolytische Wirkung auf, die abhängig von der Konzentration und Expositionsdauer zu Organschäden bis zum akuten Organversagen sowie zur Neuropathie führt²¹¹. Der Arbeitsplatzgrenzwert, der festlegt, welchen Höchstkonzentrationen in der Luft ein Arbeitnehmer für 40 Stunden pro Woche ausgesetzt sein darf, liegt bei 16 µg m⁻³²¹². Die an den technischen Anlagen gemessenen Konzentrationen liegen hier deutlich (~ x 10³) darunter, die erreichte Höchstkonzentration in den Satellitenexperimenten (2,3 µg m⁻³) liegt um das 7-fache unter dem Arbeitsplatzgrenzwert. Da eine Mitarbeiterexposition an Biogasanlagen

höchstens kurzzeitig erfolgt, kann demnach eine Gefährdung anhand der vorliegenden Daten nicht vermutet werden.

Volatiles As in Biogas oder Biomethan wird in Richtwerttabellen bisher nicht aufgeführt. Die *European Biogas Association* weist darauf hin, dass in Biomethan nicht mit volatilen Metallen zurechnen ist ²¹³. Neue Anwendungen, wie die chemische Aufbereitung des Biogases zu Biomethan, sorgen für eine höhere Energiedichte und sind somit interessant für Speichertechnologien sowie für die Nutzung in Gasmotoren (siehe Absatz 2.6.2). Die klassischen Gasreinigungsverfahren zur Aufbereitung von Biogas zu Biomethan basieren auf Verfahren zur Gaswäsche. Diese reichen häufig alleine nicht aus, um die erforderliche Reinheit zu erreichen und werden daher in kombinierten Verfahren, beispielsweise aus Druckwasserwäsche und anschließender Entfernung des Rest-CO₂ mittels Zeolithenabsorption durchgeführt ⁷⁵. Neue Ansätze basieren auf dem Prinzip des Sabatierprozesses ¹²⁷ wobei chemisch CO₂ mit zusätzlichem H₂ zu CH₄ und H₂O umgesetzt wird. Die Bedingungen für diesen Prozess sind hohe Drücke (bis 100 bar), Temperaturen zwischen 250 und 550 °C und die Verwendung eines Katalysators mit aktiver Ni-Oberfläche ^{214,215}.

Bisher werden in der Literatur als Katalysatorgifte Chlorverbindungen, Teer, Partikel, Ammoniak-, Schwefelverbindungen und Alkalien aufgeführt. Zudem sind Mechanismen bekannt, wie Dampf-Feststoff-Reaktionen, thermische Degradierung, Fouling, sowie mechanische Faktoren wie Abnutzung und Zerstoßung ²¹⁴. Ni bildet mit As stabile Verbindungen aus. Beispielsweise mit den Salzen von AsH₃ werden stabile Nickelarsenide ausgebildet, die neben kovalenten auch Metall-Metallbindungen enthalten und Schmelzpunkte über 900° C aufweisen ²¹⁶. Diese führen zur Belegung der aktiven Zentren des Katalysatormaterials, einhergehend mit Effektivitätsverlust und einer Verkürzung der Standzeit. Ein ähnlicher Effekt ist auch für Katalysatoren im Mobilitätssektor möglich. Für die Abgasnachbehandlung von Gasfahrzeugen werden 3-Wege-Katalysatoren eingesetzt, wie sie auch bei Ottomotoren verwendet werden. Aus verschiedenen Gründen wird das Trägermaterial bei Gasmotoren hauptsächlich mit Palladium beschichtet ²¹⁷. Es ist jedoch nicht klar, ob die As-Spezies aus der Gasphase unter relevanten Bedingungen Verbindungen mit Palladium eingehen.

4.7.6 Zusammenfassung

Die Annahme, dass Metalloide durch Gärsubstrat in Biogasanlagen gelangen, bestätigte sich in allen untersuchten Biogas- und Kläranlagen. Am Beispiel von Arsen konnte gezeigt werden, dass durch die mikrobielle Gemeinschaft Hydrierung und Methylierung und in Folge die

Bildung neuer Verbindungen und Spezies stattfindet. In der Flüssig- und Gasphase konnten methylierte Arsenverbindungen, in letzterer zudem AsH_3 , nachgewiesen werden. Satellitenreaktoren, welchen in verschiedenen Konzentrationen Arsen zugegeben wurde, zeigten einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Gasproduktion, einhergehend mit der Akkumulation von Essigsäure. Ebenfalls konzentrationsabhängig wurde ein mehr oder weniger deutlich ausgeprägter Erholungseffekt festgestellt. Die gemessenen Konzentrationen toxischer Verbindungen in der Gasphase stellen in den durchgeführten Versuchen aufgrund geringer Konzentration keine Gefahr für Mensch und Umwelt dar. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Nutzbarkeit des Gases für Folgeprozesse durch die Arsenverbindungen in der Gasphase beeinflusst wird.

5. Ausblick

Die Substratflexibilisierung erwies sich als geeignetes Instrument, um eine bedarfsgesteuerte Biogasproduktion zu ermöglichen (Abschnitt 4.5). Die Substratmischung beinhaltete im Versuch neben Gülle einen hohen Anteil an Energiepflanzen und nachwachsenden Rohstoffen. Hieraus entwickelte sich ein stabiler Prozess. Folgeuntersuchungen können zum Ziel haben, den Prozess im Hinblick auf den Einsatz von Bioabfällen und Abfällen aus dem Nahrungsmittelgewerbe zu optimieren. Dies würde Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit steigern und zudem die Substratquellen auf Städte und Kommunen ausweiten. Unter Umständen kann es notwendig sein, Bio- und Gewerbeabfälle zu mischen, um einen gleichbleibenden Gehalt an schnell verfügbaren Kohlenstoffquellen zu schaffen und die Gasproduktion nach den Fütterungspausen schnell wieder zu steigern. Ein weiterer Aspekt ist die Simulierung verschiedener Bedarfsprofile, beispielweise der Stromspitzen von Industriebetrieben oder kommunaler Abnehmer, um herauszufinden, ob eine zuverlässige Bereitstellung erzielt werden kann.

Trotz der besseren ökonomischen und ökologischen Bilanz gegenüber der Nutzung von Energiepflanzen erwiesen sich Dünger, die aus Vergärung und Kompostierung von biogenen Abfallstoffen gewonnen werden, als Vektor für Mikroplastikpartikel in die Umwelt (Abschnitt 4.6). Um die Ergebnisse zu validieren, ist es notwendig, zunächst weitere Anlagen zu untersuchen, um statistisch gesicherte Aussagen über die Partikelanzahl und die Verteilung der Polymersorten zu treffen. Studien haben zudem gezeigt, dass MPP in die Nahrungskette gelangen kann ⁸⁹. Inkubationsversuche mit fluoreszierenden Partikeln können Erkenntnisse darüber geben, ob es infolgedessen zu einer direkten Aufnahme in Zellen kommt. Inkubationsversuche mit verschiedenen Tierzelllinien und Untersuchungen von Zellen der Organe, die in direkten Kontakt mit aufgenommenen Partikeln kommen, können hierüber Aufschluss geben. Weitere Fragestellungen betreffen die Eindämmung des Eintrages von Partikeln in die Umwelt. Ein sinnvoller Ansatz wäre die Etablierung einer einheitlichen Methodik für die Ermittlung der Partikelanzahl und die Erweiterung der Grenzwerte auch auf kleinere Partikel. Bei Überschreitung bietet sich die Möglichkeit der thermischen Behandlung unter Druck oder die Verbrennung der Gärreste ¹⁸². Ein weiterer Ansatz kann die Erforschung und Identifizierung von Mikroorganismen sein, die in der Lage sind, Kunststoffe abzubauen. Kürzlich wurde beispielweise ein Bakterienstamm isoliert, der PET abbauen kann ²¹⁸. Da ein Großteil des Mikroplastiks aus der unsachgerechten Entsorgung stammt, sollte zudem die

Bevölkerung stärker sensibilisiert werden. Für verursachende Betriebe könnten gesetzliche Regelungen zur Entfernung von Verpackungen eingeführt werden.

Wie die Arsenanalysen zeigen, findet eine mikrobiell bedingte Volatilisierung von Arsenverbindungen in Biogasanlagen statt (Absatz 4.7.1). Da ein Zusammenhang zwischen eingesetztem Arsen in den Satellitenexperimenten zu der Menge an gebildeten volatilen Verbindungen zu bestehen scheint (Absatz 4.7.2), sollte das Spektrum der untersuchten Anlagen auf weitere Regionen mit höherer Grundbelastung erweitert werden. Ähnlicher interessant wäre die Untersuchung von Anlagen mit weiterem Substratspektrum (Lebensmittel, Fischabfälle usw.). Um längerfristige Auswirkungen auf die Mikrobiologie zu erforschen, eignet sich das in Absatz 3.5.2 vorgestellte Trockenfermentationsmodell, da dieses nach einer relativ kurzen Zeit eine stabile mikrobielle Zusammensetzung etabliert (Abschnitt 4.4). Um den Effekt von volatilen Arsenverbindungen auf weiterverarbeitende Prozesse, insbesondere auf Katalysatoren (Absatz 2.6.2 und 4.7.5), zu untersuchen, bieten sich Modellaufbauten im Labormaßstab an. Eine Möglichkeit stellt ein an der Universität Bayreuth entwickelter Sensor zur Charakterisierung von Katalysatormaterial dar ²¹⁹. Ein moderner Ansatz zur Aufbereitung von Biogas zu *Liquified Natural Gas* (LNG) wird von Grope und Scholwin vorgestellt ⁷⁵. Hierdurch kann die Energiedichte deutlich erhöht werden. Während der Aufbereitung werden mittels Aktivkohlefilter und eines sukzessiven Kryoschritts unter anderem flüchtige organische Verbindungen (VOC) abgetrennt. Eventuell eignet sich dieses Abtrennungsprinzip auch für die Entfernung von methylierten Arsenverbindungen.

Als Basis für vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse ist die Qualität der extrahierten Nukleinsäuren von hoher Bedeutung. Resultierend aus der Substratzusammensetzung, verschiedener Gärhilfsmittel, teilweise hohe Mengen an Eisen oder Aluminiumsalzen, sowie Metaboliten, die aus dem anaeroben Abbauprozess und aus der vorherigen Silierung stammen können die Zusammensetzungen von Proben aus Biogasanlagen stark schwanken (Absatz 2.2.1 und Abschnitt 3.7). Kommerziell erhältliche Kits, die häufig in der Literatur verwendet werden, haben sich in exemplarischen Untersuchungen für die ausgewählten Biogasanlagen nicht bewährt (s. Kapitel 4.1). Wichtig wäre es deshalb, in einer umfassenden Studie die Anwendbarkeit von Extraktionsmöglichkeiten auf Proben aus einem möglichst breiten Anlagenspektrum zu untersuchen und resultierend daraus einen Standard vorzuschlagen, der zu einer einheitlichen Qualität wissenschaftlicher Studien führt.

Quellenverzeichnis

1. BMUB. Übereinkommen von Paris. Available at http://www.bmub.bund.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Klimaschutz/paris_abkommen_bf.pdf (2015).
2. BMUB. Klimaschutzplan 2050. Available at https://www.bmub.bund.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Klimaschutz/klimaschutzplan_2050_bf.pdf (2016).
3. Antranikian, G. (ed.). *Angewandte Mikrobiologie* (Springer, Berlin, 2006).
4. Malik, A., Grohmann, E. & Alves, M. *Management of microbial resources in the environment* (Springer, Dordrecht, 2013).
5. Madigan, M. T., Brock, T. D. & Sahm, K. *Mikrobiologie*. 13th ed. (Pearson, Harlow [u.a.], Harlow [u.a.], 2014).
6. Statistisches Bundesamt. *Bioenergie in Deutschland* (Statistisches Bundesamt, 2016).
7. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe. Leitfaden Biogasaufbereitung und -Einspeisung (2014).
8. Statistisches Bundesamt 2017. Available at <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/257365/umfrage/biomuelleinsatz-in-behandlungsanlagen-in-deutschland/>.
9. Gu, L., Zhang, Y.-X., Wang, J.-Z., Chen, G. & Battye, H. Where is the future of China's biogas? Review, forecast, and policy implications. *Petroleum Science* **13**, 604–624; 10.1007/s12182-016-0105-6 (2016).
10. KTBL. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. *KTBL Kongress Tagungsband* (2017).
11. Renneberg, R. *Biotechnologie für Einsteiger*. 3rd ed. (Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 2010).
12. Sethi, A. K. *The European Edisons. Volta, Tesla, and Tigerstedt* (Palgrave Macmillan US, 2016).
13. Wolfe, R. S. in *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, edited by J. G. Ferry (Springer US, Boston, MA, 1993), pp. 1–32.

14. Lamont-Brown, R. *Humphry Davy. Life Beyond the Lamp* (Sutton, 2004).
15. Pullen, T. *Anaerobic Digestion – Making Biogas – Making Energy. The Earthscan Expert Guide* (Taylor & Francis, 2015).
16. Genevois, L. L'agriculture française peut-elle acquérir son autonomie énergétique`. *Noroi*, 281–288 (1981).
17. Khanal, S. K. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications* (Wiley, 2011).
18. IEA. *IEA Bioenergy Task 37, Biogas country overview. 2010.* (International Energy Agency, 2010).
19. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe. Leitfaden Biogas. Von der Gewinnung zur Nutzung (2016).
20. Rittmann, S. K.-M. R., Seifert, A. H. & Krajete, A. Biomethanisierung — ein Prozess zur Ermöglichung der Energiewende? *BIOspektrum* **20**, 816–817; 10.1007/s12268-014-0521-3 (2014).
21. Ziemiński, K. & Frąć, M. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology* **11**, 4127–4139; 10.5897/AJBX11.054 (2012).
22. Drake, H. L., Horn, M. A. & Wüst, P. K. Intermediary ecosystem metabolism as a main driver of methanogenesis in acidic wetland soil. *Environmental microbiology reports* **1**, 307–318; 10.1111/j.1758-2229.2009.00050.x (2009).
23. Bajpai, P. in *Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry*, edited by P. Bajpai (Springer Singapore, Singapore, 2017), pp. 7–12.
24. Weiland, P. Biogas production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **85**, 849–860; 10.1007/s00253-009-2246-7 (2010).
25. Zverlov, V. V., Köck, D. E. & Schwarz, W. H. in *Microorganisms in Biorefineries*, edited by B. Kamm (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015), pp. 335–361.
26. Drake, H. L., Küsel, K. & Matthies, C. in *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*, edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Springer New York, New York, NY, 2006), pp. 354–420.

27. Schnurrer, A. & Jarvis, A. Microbiological handbook for biogas plants. Swedish Waste Management U2009:03. *Swedish Gas Centre Report*, 1–74 (2010).
28. Goswami, R. *et al.* An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities. A step towards sustainable waste management. *3 Biotech* **6**, 72; 10.1007/s13205-016-0395-9 (2015).
29. Schink, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 262–280 (1997).
30. Zehnder, A.J.B. *Biology of anaerobic microorganisms* (John Wiley & Sons, Incorporated, 1988).
31. Leigh, J. A. in *Methods in Enzymology : Methods in Methane Metabolism, Part A*, edited by A. C. Rosenzweig & S. W. Ragsdale (Academic Press 2011), pp. 111–118.
32. DasSarma, S., Coker, J. A. & DasSarma, P. *Archaea* (University of Maryland Biotechnology Institute, 2009).
33. Blaut, M. Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**, 187–208 (1994).
34. Browne, P. D. & Cadillo-Quiroz, H. Contribution of Transcriptomics to Systems-Level Understanding of Methanogenic Archaea. *Archaea* **2013**, 11; 10.1155/2013/586369 (2013).
35. Sarmiento, F. B., Leigh, J. A. & Whitman, W. B. in *Methods in Enzymology : Methods in Methane Metabolism, Part A*, edited by A. C. Rosenzweig & S. W. Ragsdale (Academic Press 2011), pp. 43–73.
36. Ferry, J. G. Methane from acetate. *Journal of Bacteriology* **174**, 5489–5495 (1992).
37. Torsvik, V., Goksøyr, J. & Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* **56**, 782–787 (1990).
38. Welch, R. A. *et al.* Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 17020–17024; 10.1073/pnas.252529799 (2002).
39. Ottow, J.C.G. *Mikrobiologie von Böden. Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik* (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
40. Kowalchuk, G. A., Akkermans, A. D., Head, I. M., Bruijn, F. J. de & van Elsas, J. D. (eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual* (Springer, New York, 2007).

41. Weiss, A., Jérôme, V. & Freitag, R. Comparison of strategies for the isolation of PCR-compatible, genomic DNA from a municipal biogas plants. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **853**, 190–197; 10.1016/j.jchromb.2007.03.009 (2007).
42. Liu, D. *Handbook of nucleic acid purification* (CRC Press, Boca Raton, 2009).
43. Ranjard, L. *et al.* Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints. Biological and Methodological Variability. *Applied and environmental microbiology* **67**, 4479–4487; 10.1128/AEM.67.10.4479-4487.2001 (2001).
44. Weig, A. R., Peršoh, D., Werner, S., Betzlbacher, A. & Rambold, G. Diagnostic assessment of mycodiversity in environmental samples by fungal ITS1 rDNA length polymorphism. *Mycological progress* **12**, 719–725 (2013).
45. Fotidis, I. A., Karakashev, D., Kotsopoulos, T. A., Martzopoulos, G. G. & Angelidaki, I. Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *Microbiology Ecology* **83**, 38–48; 10.1111/j.1574-6941.2012.01456.x (2013).
46. Rademacher, A., Nolte, C., Schönberg, M. & Klocke, M. Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Applied microbiology and biotechnology* **96**, 565–576; 10.1007/s00253-012-4348-x (2012).
47. Ciesielski, S. *et al.* Ribosomal intergenic spacer analysis as a tool for monitoring methanogenic Archaea changes in an anaerobic digester. *Current Microbiology* **67**, 240–248; 10.1007/s00284-013-0353-2 (2013).
48. Satpathy, P., Steinigeweg, S., Cypionka, H. & Engelen, B. Different substrates and starter inocula govern microbial community structures in biogas reactors. *Environmental Technology* **37**, 1441–1450; 10.1080/09593330.2015.1118559 (2016).
49. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463–5467 (1977).

50. Shokralla, S., Spall, J, L., Gibson, J, F. & Hajibabei, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* **21**, 1794–1805; 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x (2012).
51. Zakrzewski, M. *et al.* Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *Special Issue: ESF Conference (Microbes and Industrial Biotechnology)* **158**, 248–258; 10.1016/j.jbiotec.2012.01.020 (2012).
52. Campanaro, S. *et al.* Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels* **9**, 5478; 10.1186/s13068-016-0441-1 (2016).
53. Luo, G., Fotidis, I. A. & Angelidaki, I. Comparative analysis of taxonomic, functional, and metabolic patterns of microbiomes from 14 full-scale biogas reactors by metagenomic sequencing and radioisotopic analysis. *Biotechnology for Biofuels* **9**, 51; 10.1186/s13068-016-0465-6 (2016).
54. Kalia, V. C. *Microbial Factories. Biofuels, Waste treatment* (Springer India, 2016).
55. Lueders, T. & Friedrich, M. W. Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and mcrA Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. *Applied and environmental microbiology* **69**, 320–326; 10.1128/AEM.69.1.320-326.2003 (2003).
56. Schneegurt, M. A. & Kulpa, C. F. The Application of Molecular Techniques in Environmental Biotechnology for Monitoring Microbial Systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **27**, 73–79; 10.1111/j.1470-8744.1998.tb01377.x (1998).
57. Narihiro, T. & Sekiguchi, Y. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microbial biotechnology* **4**, 585–602; 10.1111/j.1751-7915.2010.00239.x (2010).
58. Case, R. J. *et al.* Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and environmental microbiology* **73**, 278–288; 10.1128/AEM.01177-06 (2007).

59. Yu, Y., Kim, J. & Hwang, S. Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnology and bioengineering* **93**, 424–433; 10.1002/bit.20724 (2006).
60. Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J. & Riley, P. W. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfillb. *Microbiology* **148**, 3521–3530; 10.1099/00221287-148-11-3521 (2002).
61. Steinberg, L. M. & Regan, J. M. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and environmental microbiology* **74**, 6663–6671; 10.1128/AEM.00553-08. (2008).
62. Morris, R. *et al.* Methyl coenzyme M reductase (mcrA) gene abundance correlates with activity measurements of methanogenic H₂/CO₂-enriched anaerobic biomass. *Microbial biotechnology* **7**, 77–84; 10.1111/1751-7915.12094 (2013).
63. Vaksmaa, A., Jetten, M. S. M., Ettwig, K. F. & Lüke, C. McrA primers for the detection and quantification of the anaerobic archaeal methanotroph ‘Candidatus Methanoperedens nitroreducens’. *Applied microbiology and biotechnology* **101**, 1631–1641; 10.1007/s00253-016-8065-8 (2016).
64. Alvarado, A. *et al.* Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Frontiers in Microbiology* **5**, 597; 10.3389/fmicb.2014.00597 (2014).
65. De la Rubia, M., Riau, V., Raposo, F. & Borja, R. Thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge: focus on the influence of the start-up. A review. *Critical reviews in biotechnology* **33**, 448–460; 10.3109/07388551.2012.726962 (2013).
66. Sultana, R., Kobayashi, K. & Kim, K.-H. Comparison of arsenic uptake ability of barnyard grass and rice species for arsenic phytoremediation. *Environmental Monitoring and Assessment* **187**, 4101; 10.1007/s10661-014-4101-2 (2014).
67. Tian, Z., Zhang, Y., Li, Y., Chi, Y. & Yang, M. Rapid establishment of thermophilic anaerobic microbial community during the one-step startup of thermophilic anaerobic digestion from a mesophilic digester. *Water Research* **69**, 9–19; 10.1016/j.watres.2014.11.001 (2015).

68. Palatsi, J., Gimenez-Lorang, A., Ferrer, I. & Flotats, X. Start-up strategies of thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water science and technology* **59**, 1777–1784; 10.2166/wst.2009.180 (2009).
69. McMahon, K. D., Zheng, D., Stams, Alfons J M, Mackie, R. I. & Raskin, L. Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnology and bioengineering* **87**, 823–834; 10.1002/bit.20192 (2004).
70. Bolzonella, D., Innocenti, L., Pavan, P., Traverso, P. & Cecchi, F. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: focusing on the start-up phase. *Bioresource Technology* **86**, 123–129; 10.1016/S0960-8524(02)00161-X (2003).
71. Qu, X. *et al.* Combined monitoring of changes in delta13CH4 and archaeal community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 236–245; 10.1111/j.1574-6941.2009.00661.x (2009).
72. Brambilla, M. *et al.* Monitoring of the startup phase of one continuous anaerobic digester at pilot scale level. *Biomass and Bioenergy* **36**, 439–446; 10.1016/j.biombioe.2011.11.009 (2012).
73. Chachkhiani, M. *et al.* 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology* **93**, 227–232; 10.1016/j.biortech.2003.11.005 (2004).
74. Klang, J. *et al.* Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microbial biotechnology*; 10.1111/1751-7915.12263 (2015).
75. Grope, J. & Scholwin, F. Bio-LNG-Technologien und Perspektiven in Deutschland und Europa. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. *KTBL Kongress Tagungsband* **2017**.
76. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR). Bioenergiedörfer. Leitfaden für eine praxisnahe Umsetzung (2014).
77. Barchmann, T. *et al.* Erweiterung der Flexibilität von Biogasanlagen – Substratmanagement, Fahrplansynthese und ökonomische Bewertung. Available at

<http://www.landtechnik-online.eu/ojs-2.4.5/index.php/landtechnik/article/view/3146>
(2016).

78. Mauky, E. *et al.* Demand-driven biogas production by flexible feeding in full-scale – Process stability and flexibility potentials. *Anaerobe* **46**, 86–95; 10.1016/j.anaerobe.2017.03.010 (2017).
79. Mulat, D. G. *et al.* Changing Feeding Regimes To Demonstrate Flexible Biogas Production. Effects on Process Performance, Microbial Community Structure, and Methanogenesis Pathways. *Applied and environmental microbiology* **82**, 438–449; 10.1128/AEM.02320-15 (2016).
80. Lemmer, A. & Krümpel, J. Demand-driven biogas production in anaerobic filters. *Applied Energy* **185**, 885–894; 10.1016/j.apenergy.2016.10.073 (2017).
81. Hahn, H., Ganagin, W. & Hartmann, K. (eds.). *Flexible biogas production with the ReBi biogas plant configuration for balancing power generation* (2014).
82. Lou, X. F. & Nair, J. The impact of landfilling and composting on greenhouse gas emissions – A review. *Bioresource Technology* **100**, 3792–3798; 10.1016/j.biortech.2008.12.006 (2009).
83. Lampert, C., Tesar, M. & Thaler, P. Klimarelevanz und Energieeffizienz der Verwertung biogener Abfälle (KEVBA), 2011.
84. Plastics Europe. *Plastics - The facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data* (Plastics Europe, 2016).
85. Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* **3**; 10.1126/sciadv.1700782 (2017).
86. European Commission. *Green Paper - On a European Strategy on Plastic Waste in the Environment* (European Commission, 2013).
87. Jambeck, J. R. *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (New York, N.Y.)* **347**, 768; 10.1126/science.1260352 (2015).
88. Fotopoulou, K. N. & Karapanagioti, H. K. Degradation of Various Plastics in the Environment, 1–22; 10.1007/698_2017_11 (2017).
89. Wright, S. L., Thompson, R. C. & Galloway, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **178**, 483–492; 10.1016/j.envpol.2013.02.031 (2013).

90. Ivar do Sul, J. A. & Costa, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **185**, 352–364; 10.1016/j.envpol.2013.10.036 (2014).
91. McCormick, A., Hoellein, T. J., Mason, S. A., Schluep, J. & Kelly, J. J. Microplastic is an Abundant and Distinct Microbial Habitat in an Urban River. *Environmental Science & Technology* **48**, 11863–11871; 10.1021/es503610r (2014).
92. Browne, M. A. *et al.* Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide. Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology* **45**, 9175–9179; 10.1021/es201811s (2011).
93. Lithner, D., Larsson, Å. & Dave, G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of The Total Environment* **409**, 3309–3324; 10.1016/j.scitotenv.2011.04.038 (2011).
94. Rochman, C. M. *et al.* Policy. Classify plastic waste as hazardous. *Nature* **494**, 169–171; 10.1038/494169a (2013).
95. Zbyszewski, M. & Corcoran, P. L. Distribution and Degradation of Fresh Water Plastic Particles Along the Beaches of Lake Huron, Canada. *Water, Air, & Soil Pollution* **220**, 365–372; 10.1007/s11270-011-0760-6 (2011).
96. Imhof, H. K., Ivleva, N. P., Schmid, J., Niessner, R. & Laforsch, C. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology* **23**; 10.1016/j.cub.2013.09.001 (2013).
97. Wagner, M. *et al.* Microplastics in freshwater ecosystems. What we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* **26**, 12; 10.1186/s12302-014-0012-7 (2014).
98. Browne, M. A. *et al.* Accumulation of microplastic on shorelines worldwide. Sources and sinks. *Environmental Science & Technology* **45**; 10.1021/es201811s (2011).
99. Vernon, R. E. Which Elements Are Metalloids? *Journal of Chemical Education* **90**, 1703–1707; 10.1021/ed3008457 (2013).
100. Mulligan, C. N. & Yong, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International* **30**, 587–601; 10.1016/j.envint.2003.11.001 (2004).
101. Wang, S. & Mulligan, C. N. Occurrence of arsenic contamination in Canada. Sources, behavior and distribution. *Science of The Total Environment* **366**, 701–721; 10.1016/j.scitotenv.2005.09.005 (2006).

102. Sohel, N. *et al.* Arsenic in Drinking Water and Adult Mortality. A Population-based Cohort Study in Rural Bangladesh. *Epidemiology* **20**, 824–830 (2009).
103. WHO. Arsenic Fact Sheet. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/> (2016).
104. Acharyya, S. K., Lahiri, S., Raymahashay, B. C. & Bhowmik, A. Arsenic toxicity of groundwater in parts of the Bengal basin in India and Bangladesh. The role of Quaternary stratigraphy and Holocene sea-level fluctuation. *Environmental Geology* **39**, 1127–1137; 10.1007/s002540000107 (2000).
105. García-Sánchez, A., Moyano, A. & Mayorga, P. High arsenic contents in groundwater of central Spain. *Environmental Geology* **47**, 847–854; 10.1007/s00254-004-1216-8 (2005).
106. Wedepohl, K. H. in *Elements and Their Compounds in the Environment* (Wiley-VCH Verlag GmbH 2008), pp. 2–16.
107. Lepp, N. W. *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants. Effects of trace metals on plant function* (Applied Science Publishers, 1981).
108. Banning, A., Coldewey, W. G. & Göbel, P. A procedure to identify natural arsenic sources, applied in an affected area in North Rhine-Westphalia, Germany. *Environmental Geology* **57**, 775; 10.1007/s00254-008-1355-4 (2008).
109. Geuß, U., Hangen, E. & Martin, W. *Hintergrundwerte von anorganischen und organischen Schadstoffen in Böden Bayerns. Vollzugshilfe für den vorsorgenden Bodenschutz mit Bodenausgangsgesteinskarte von Bayern 1:500 000* (Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU), 2011).
110. Fishbein, L. Sources, transport and alterations of metal compounds. An overview. I. Arsenic, beryllium, cadmium, chromium, and nickel. *Environmental Health Perspectives* **40**, 43–64 (1981).
111. Irgolic, K. J., Ilger, D., Zingaro, R. A., Spall, D. & Puri, B. K. Determination of arsenic and arsenic compounds in natural gas samples. *Applied Organometallic Chemistry* **5**, 117–124; 10.1002/aoc.590050209 (1991).
112. Xu, R. *et al.* Exploration of Detection Technology about Arsenic Content in Natural Gas and Application. *Energy & Fuels* **29**, 3863–3869; 10.1021/ef5028907 (2015).

113. Nziguheba, G. & Smolders, E. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Science of The Total Environment* **390**, 53–57; 10.1016/j.scitotenv.2007.09.031 (2008).
114. *BMJV, Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln. DüMV* (2012).
115. Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A. & McGrath, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* **181**, 777–794; 10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x (2009).
116. Lomax, C. *et al.* Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytologist* **193**, 665–672; 10.1111/j.1469-8137.2011.03956.x (2012).
117. Asher, C. J. & Reay, P. F. Arsenic Uptake by Barley Seedlings. *Functional Plant Biology* **6**, 459–466; 10.1071/PP9790459 (1979).
118. Jacobs, L. W. & Keeney, D. R. Arsenic - phosphorus interactions on corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **1**, 85–93; 10.1080/00103627009366245 (1970).
119. Sadiq, M. Solubility relationships of arsenic in calcareous soils and its uptake by corn. *Plant and Soil* **91**, 241–248; 10.1007/BF02181791 (1986).
120. Koch, K., Gepperth, S., Andrade, D., Ebertseder, F. & Gronauer, A. Hilfsmiteileinsatz bei der Biogaserzeugung–Überblick und Erfahrungen aus Labor und Praxis. *Gülzower Fachgespräche* **35**, 16–31 (2010).
121. Gosio, B. *Sul riconoscimento dell'arsenico per mezzo di alcune mufte. Contributo alla tossicologia dell'arsenico* (Tip. delle Mantellate, 1892).
122. Bentley, R. & Chasteen, T. G. Microbial Methylation of Metalloids. Arsenic, Antimony, and Bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 250–271; 10.1128/MMBR.66.2.250-271.2002 (2002).
123. Vahidnia, A., van der Voet, G. B. & Wolff, F. A. de. Arsenic neurotoxicity--a review. *Human & experimental toxicology* **26**, 823–832; 10.1177/0960327107084539 (2007).
124. Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S. & Thomas, D. J. Arsenic Exposure and Toxicology. A Historical Perspective. *Toxicological Sciences* **123**, 305–332; 10.1093/toxsci/kfr184 (2011).

125. Wuerfel, O., Thomas, F., Schulte, S., M, Hensel, R. & Diaz-Bone ,A., R. Mechanism of multi-metal(loid) methylation and hydride generation by methylcobalamin and cob(I)alamin. A side reaction of methanogenesis. *Applied Organometallic Chemistry* **26**, 94–101; 10.1002/aoc.2821 (2012).
126. Thomas, F. *et al.* Connection between Multimetal(loid) Methylation in Methanoarchaea and Central Intermediates of Methanogenesis. *Applied and environmental microbiology* **77**, 8669–8675; 10.1128/AEM.06406-11 (2011).
127. Sabatier, P. *Process of manufacturing methane or of mixtures of methane and hydrogen* (Google Patents, 1910), <https://www.google.com/patents/US956734>.
128. Yu, Y., Lee, C. & Hwang, S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Science & Technology* **52**, 85 (2005).
129. Cardinale, M. *et al.* Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Applied and environmental microbiology* **70**, 6147–6156; 10.1128/AEM.70.10.6147-6156.2004 (2004).
130. Löder, M. G. J., Kuczera, M., Mintenig, S., Lorenz, C. & Gerdt, G. Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples. *Environmental Chemistry* **12**, 563–581 (2015).
131. Thrän, D., Liebetrau, J. & Pfeiffer, D. Messmethodensammlung Biogas: Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich. *Schriftenreihe des BMU-Förderprogramms „Energetische Biomassenutzung“* (2012).
132. Kreader, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and environmental microbiology* **62**, 1102–1106 (1996).
133. Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology* **63**, 3741–3751 (1997).
134. Fouad, A. F. *Endodontic microbiology* (Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2009).
135. Schriewer, A., Wehlmann, A. & Wuertz, S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of microbiological methods* **85**, 16–21; 10.1016/j.mimet.2010.12.027 (2011).

136. Fisher, M. M. & Triplett, E. W. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Applied and environmental microbiology* **65**, 4630–4636 (1999).
137. Rastogi, G. & Sani, R. K. in *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, edited by I. Ahmad, F. Ahmad & J. Pichtel (Springer New York, New York, NY, 2011), pp. 29–57.
138. Weithmann, N., Weig, A. R. & Freitag, R. Process parameters and changes in the microbial community patterns during the first 240 days of an agricultural energy crop digester. *Applied Microbiology and Biotechnology Express* **6**, 53; 10.1186/s13568-016-0219-7 (2016).
139. Sundberg, C. *et al.* 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology* **85**, 612–626; 10.1111/1574-6941.12148 (2013).
140. Ilgen, G. & Huang, J.-H. An automatic cryotrapping and cryofocussing system for parallel ICP-MS and EI-MS detection of volatile arsenic compounds in gaseous samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**, 293–300; 10.1039/C2JA30251A (2013).
141. Bergmann, I. *et al.* Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and applied microbiology* **33**, 78–84; 10.1016/j.syapm.2009.11.004 (2010).
142. Upton, S. *Analytical Molecular Biology. Quality and Validation* (The Royal Society of Chemistry, 1999).
143. Hauk, A. Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* **43**, 278; 10.1002/biuz.201390093 (2013).
144. Lindqvist, I. & Bergman, B. Differential Spectrophotometry on Humic Acids. *Acta Chemica Scandinavica* **20** (1996).
145. Walker, J, M. Proteins - Calculations and Interpretative Questions. *Biochemical Education*, 89 (1993).
146. Wilson, K. in *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc2001).
147. Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113–116; 10.1007/BF02670468 (1993).

148. Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N. & Veal, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological procedures online* **1**, 40–47; 10.1251/bpo6 (1998).
149. Holden, M. J. *et al.* Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 2468–2474; 10.1021/jf0211130 (2003).
150. McGregor, D. P. *et al.* Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA fragments. *Biotechniques* **21**, 463 (1996).
151. Purahong, W. *et al.* Influence of Commonly Used Primer Systems on Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Bacterial Communities in Environmental Samples. *PLOS ONE* **10**, e0118967; 10.1371/journal.pone.0118967 (2015).
152. Lemmer, A. & Preißler, D. Biogas: So halten Sie die Methanbakterien auf Trab. *top agrar*, 106–109 (2006).
153. Biogasforum Bayern. Empfehlungen zu Verfahren der Hydrolyse in der Praxis (2013).
154. Gottschalk, G. *Bacterial Metabolism*. 2nd ed. (Springer Berlin Heidelberg, 1986).
155. Lucas, R., Kuchenbuch, A., Fetzer, I., Harms, H. & Kleinsteuber, S. Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiology Ecology* **91**; 10.1093/femsec/fiv004 (2015).
156. Müller, B., Sun, L., Westerholm, M. & Schnürer, A. Bacterial community composition and fhs profiles of low- and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria. *Biotechnology for Biofuels* **9**, 48; 10.1186/s13068-016-0454-9 (2016).
157. Liu, Y., Qiao, J.-T., Yuan, X.-Z., Guo, R.-B. & Qiu, Y.-L. *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 1756–1762; 10.1099/ij.s.0.060186-0 (2014).
158. Trachtenberg, S. Mollicutes. *Current Biology* **15**, R483-R484; 10.1016/j.cub.2005.06.049 (2005).

159. Whitman, W. B. (ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (John Wiley & Sons, Ltd, 2015).
160. Lebuhn, M., Munk, B. & Effenberger, M. Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energy, Sustainability and Society* **4**, 10; 10.1186/2192-0567-4-10 (2014).
161. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Brock, T. D. *Brock - Mikrobiologie*. 11th ed. (Pearson Studium, München [u.a.], 2009).
162. Kranert, M. & Cord-Landwehr, K. *Einführung in die Abfallwirtschaft*. 4th ed. (Vieweg+Teubner Verlag / GWV Fachverlage, Wiesbaden, Wiesbaden, 2010).
163. Gegner, M. Direktvermarktung von Biogasstrom - ein Bericht aus der Praxis. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. *KTBL Kongress Tagungsband* (2017).
164. Liu, Y. in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, edited by K. N. Timmis (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010), pp. 595–604.
165. Karakashev, D., Batstone, D. J. & Angelidaki, I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and environmental microbiology* **71**, 331–338; 10.1128/AEM.71.1.331-338.2005 (2005).
166. Loewen, A., Brookman, H. & Ganagin. Regelbare Biogaserzeugung (ReBi) - flexible Gasproduktion mit schwervergärbaren Substraten. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. *KTBL Kongress Tagungsband* (2017).
167. Weithmann, N. *et al.* Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. *Science Advances* **4**; 10.1126/sciadv.aap8060 (2018).
168. Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C. & Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**; 10.1098/rstb.2008.0205 (2009).
169. Duis, K. & Coors, A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment. Sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe* **28**, 2; 10.1186/s12302-015-0069-y (2016).
170. Selke, S. *et al.* Evaluation of Biodegradation-Promoting Additives for Plastics. *Environmental Science & Technology* **49**, 3769–3777; 10.1021/es504258u (2015).
171. Kehres, B. *H&K aktuell, Änderung der Düngemittelverordnung* (BGK e.V., 2015).

172. Mintenig, S. M., Int-Veen, I., Löder, M.G.J., Primpke, S. & Gerdt, G. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research* **108**, 365–372; 10.1016/j.watres.2016.11.015 (2017).
173. Mahon, A. M. *et al.* Microplastics in Sewage Sludge. Effects of Treatment. *Environmental Science & Technology* **51**, 810–818; 10.1021/acs.est.6b04048 (2017).
174. Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V. & Lehtiniemi, M. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution* **185**; 10.1016/j.envpol.2013.10.013 (2014).
175. Farrell, P. & Nelson, K. Trophic level transfer of microplastic. *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ Pollut* **177**; 10.1016/j.envpol.2013.01.046 (2013).
176. Rillig, M. C. Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil? *Environmental Science & Technology* **46**, 6453–6454; 10.1021/es302011r (2012).
177. Huerta Lwanga, E. *et al.* Microplastics in the Terrestrial Ecosystem. Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental Science & Technology* **50**, 2685–2691; 10.1021/acs.est.5b05478 (2016).
178. Gaylor, M. O., Harvey, E. & Hale, R. C. Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Accumulation by Earthworms (*Eisenia fetida*) Exposed to Biosolids-, Polyurethane Foam Microparticle-, and Penta-BDE-Amended Soils. *Environmental Science & Technology* **47**, 13831–13839; 10.1021/es403750a (2013).
179. Derraik, J. G.B. The pollution of the marine environment by plastic debris. A review. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 842–852; 10.1016/S0025-326X(02)00220-5 (2002).
180. Worm, B., Lotze, H. K., Jubinville, I., Wilcox, C. & Jambeck, J. Plastic as a Persistent Marine Pollutant. *Annual Review of Environment and Resources* **42**, 1–26; 10.1146/annurev-environ-102016-060700 (2017).
181. Lebreton, L. C. M. *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. *Nature Communications* **8**, 15611; 10.1038/ncomms15611 (2017).
182. UFZ. Hydrothermale Carbonisierung HTC. Available at <https://www.ufz.de/index.php?de=37433> (2018).

183. Mehta, C. M. *et al.* in *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, edited by T. Satyanarayana & B. N. Johri (Springer Netherlands, Dordrecht, 2012), pp. 113–134.
184. Chaoui, H. I., Zibilske, L. M. & Ohno, T. Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 295–302; 10.1016/S0038-0717(02)00279-1 (2003).
185. Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M. I., Steinberg, C. & Alabouvette, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 467–476; 10.1016/S0038-0717(01)00205-X (2002).
186. Downer, A. J., Menge, J. A. & Pond, E. Association of Cellulytic Enzyme Activities in Eucalyptus Mulches with Biological Control of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **91**, 847–855; 10.1094/PHYTO.2001.91.9.847 (2001).
187. Peng, H. *et al.* Methylated Phenylarsenical Metabolites Discovered in Chicken Liver. *Angewandte Chemie* **129**, 6877–6881; 10.1002/ange.201700736 (2017).
188. Overby, L. R. & Frost, D. V. Nonretention by the chicken of the arsenic in tissues of swine fed arsanilic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* **4**, 745–751; 10.1016/0041-008X(62)90104-7 (1962).
189. D'Angelo, E., Zeigler, G., Beck, E. G., Grove, J. & Sikora, F. Arsenic species in broiler (*Gallus gallus domesticus*) litter, soils, maize (*Zea mays* L.), and groundwater from litter-amended fields. *Science of The Total Environment* **438**, 286–292; 10.1016/j.scitotenv.2012.08.078 (2012).
190. Chio, C.-P., Lin, M.-C. & Liao, C.-M. Low-cost farmed shrimp shells could remove arsenic from solutions kinetically. *Journal of Hazardous Materials* **171**, 859–864; 10.1016/j.jhazmat.2009.06.086 (2009).
191. Muñoz, O. *et al.* Total and Inorganic Arsenic in Fresh and Processed Fish Products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 4369–4376 (2000).
192. Panuccio, M. R., Logoteta, B., Beone, G. M., Cagnin, M. & Cacco, G. Arsenic uptake and speciation and the effects of phosphate nutrition in hydroponically grown kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hochst). *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 3046–3053; 10.1007/s11356-012-0820-5 (2011).

193. Jenkins, R. O. *et al.* Antimony biomethylation by mixed cultures of micro-organisms under anaerobic conditions. *Applied Organometallic Chemistry* **12**, 449–455; 10.1002/(SICI)1099-0739(199806)12:6<449::AID-AOC719>3.0.CO;2-4 (1998).
194. Mason, R. P. in *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*, edited by A. Dricu (InTech, Rijeka, 2012), Ch. 11.
195. Dopp, E. *et al.* Toxicity of Volatile Methylated Species of Bismuth, Arsenic, Tin, and Mercury in Mammalian Cells In Vitro. *Journal of Toxicology* **2011**, 7; 10.1155/2011/503576 (2011).
196. Turpeinen, R., Panssar-Kallio, M., Häggblom, M. & Kairesalo, T. Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Science of The Total Environment* **236**, 173–180; 10.1016/S0048-9697(99)00269-7 (1999).
197. Guan, X. *et al.* Diversity and arsenic-tolerance potential of bacterial communities from soil and sediments along a gold tailing contamination gradient. *Canadian Journal of Microbiology* **63**, 788–805; 10.1139/cjm-2017-0214 (2017).
198. Alaniz-Andrade, A., Letechipía, C., Ramírez-Santoyo, R., Guzmán-Moreno, J. & Vidales-Rodríguez, L. Arsenic tolerance in bacterial cultures isolated from metal contaminated soil. *Acta Universitaria*, 9–18 (2017).
199. Zhang, J. *et al.* Anaerobic Arsenite Oxidation by an Autotrophic Arsenite-Oxidizing Bacterium from an Arsenic-Contaminated Paddy Soil. *Environmental Science & Technology* **49**, 5956–5964; 10.1021/es506097c (2015).
200. Oremland, R. S. *et al.* Anaerobic Oxidation of Arsenite in Mono Lake Water and by a Facultative, Arsenite-Oxidizing Chemoautotroph, Strain MLHE-1. *Applied and environmental microbiology* **68**, 4795–4802; 10.1128/AEM.68.10.4795-4802.2002 (2002).
201. McBride, B. C. & Wolfe, R. S. Biosynthesis of dimethylarsine by Methanobacterium. *Biochemistry* **10**, 4312–4317 (1971).
202. Mestrot, A., Xie, W.-Y., Xue, X. & Zhu, Y.-G. Arsenic volatilization in model anaerobic biogas digesters. *Applied Geochemistry* **33**, 294–297; 10.1016/j.apgeochem.2013.02.023 (2013).

203. Yuan, C., Lu, X., Qin, J. I.E., Rosen, B. P. & Le, X. C. Volatile Arsenic Species Released from Escherichia coli Expressing the AsIII S-adenosylmethionine Methyltransferase Gene. *Environmental Science & Technology* **42**, 3201–3206 (2008).
204. Huang, K. *et al.* Efficient Arsenic Methylation and Volatilization Mediated by a Novel Bacterium from an Arsenic-Contaminated Paddy Soil. *Environmental Science & Technology* **50**, 6389–6396; 10.1021/acs.est.6b01974 (2016).
205. Reid, M. C. *et al.* Arsenic Methylation Dynamics in a Rice Paddy Soil Anaerobic Enrichment Culture. *Environmental Science & Technology* **51**, 10546–10554; 10.1021/acs.est.7b02970 (2017).
206. Wang, P.-P., Sun, G.-X. & Zhu, Y.-G. Identification and Characterization of Arsenite Methyltransferase from an Archaeon, Methanosarcina acetivorans C2A. *Environmental Science & Technology* **48**, 12706–12713; 10.1021/es503869k (2014).
207. Wang, P.-P., Bao, P. & Sun, G.-X. Identification and catalytic residues of the arsenite methyltransferase from a sulfate-reducing bacterium, Clostridium sp. BXM. *FEMS microbiology letters* **362**, 1–8; 10.1093/femsle/fnu003 (2015).
208. Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. Methanogens. Reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* **43**, 260–296 (1979).
209. Mass, M. J. *et al.* Methylated Trivalent Arsenic Species Are Genotoxic. *Chemical Research in Toxicology* **14**, 355–361; 10.1021/tx000251l (2001).
210. Kligerman, A. D. *et al.* Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic. Induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **42**, 192–205; 10.1002/em.10192 (2003).
211. *Begründung zu Arsin in TRGS 900* (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, 2007).
212. *Grenzwertliste 2017. Sicherheit und Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz* (Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung,).
213. Svensson, M. *Biomethane Standards. Gas quality standardisation of biomethane, going from national to international level* (2014).
214. Rönsch, S. *et al.* Review on methanation - From fundamentals to current projects. *Fuel* **166**, 276–296; 10.1016/j.fuel.2015.10.111 (2016).

215. Schröder, R. Power-to-Gas und Biogas - eine intelligente Kombination für das künftige Energiesystem. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. *KTBL Kongress Tagungsband* (2017).
216. Riedel, E. & Janiak, C. *Anorganische Chemie* (De Gruyter, 2015).
217. Dingel, O. *Gasfahrzeuge. Die Schlüsseltechnologie auf dem Weg zum emissionsfreien Antrieb?* (expert-Verlag, 2008).
218. Yoshida, S. *et al.* A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science (New York, N.Y.)* **351**, 1196–1199; 10.1126/science.aad6359 (2016).
219. Hagen, G., Leupold, N., Wiegärtner, S. & Moos, R. Sensor Tool for Fast Catalyst Material Characterization. *Topics in Catalysis* **60**, 312–317; 10.1007/s11244-016-0617-8 (2017).

Anhang

Tabellen und Ergebnisse

Tabelle A 1: Absorptionsverhältnisse der DNA-Extrakte.....	XXXVII
Tabelle A 2: Anzahl der Sequenzen - NGS verschiedener Anlagen.....	XXXVIII
Tabelle A 3: Rarefaction, OTUs und Diversität – NGS verschiedener Anlagen.....	XXXIX
Tabelle A 4: ANOSIM zur Anlaufphase (methanogene Archaeen)	XLVI
Tabelle A 5: ANOSIM zur Anlaufphase (Bakterien).....	XLVII
Tabelle A 6: Anzahl Sequenzen - NGS Anlaufphase	XLVIII
Tabelle A 7: Rarefaction, OTUs und Diversität – NGS Anlaufphase	XLIX
Tabelle A 8: ANOSIM zur Trockenfermentation (methanogene Archaeen).....	LV
Tabelle A 9: ANOSIM zur Trockenfermentation (Bakterien)	LVI
Tabelle A 10: pH-Wert und VFA-Konzentrationen bei der Flexibilisierung	LVI
Tabelle A 11: Anzahl Sequenzen – NGS Flexibilisierung.....	LXII
Tabelle A 12: Rarefaction, OTUs und Diversität – NGS Flexibilisierung	LXIII
Tabelle A 13: Elementaranalyse.....	LXXII

Tabelle A 1: Absorptionsverhältnisse der DNA-Extrakte

Die Bezeichnung der Anlagen ist in Tabelle 8, Abschnitt 3.5 im Hauptteil ersichtlich.

Bezeichnung	DNA [ng/μL] (Nanodrop)	260/280	260/230
1	50,8	1,89	1,77
2	92	1,86	2,16
3	162,6	1,87	1,78
4	81,6	1,92	1,86
5	168,8	1,93	1,82
6	276	1,91	1,97
7	168,8	1,93	1,82
8	185,1	1,91	1,5

9	99,8	1,93	1,91
10	396,9	1,93	1,68
11	217,4	1,87	1,42
12	744,3	1,9	1,74
13	48,6	1,89	1,66
14	560,6	1,91	2,12
15	458,3	1,93	1,87

Tabelle A 2: Anzahl der Sequenzen - NGS verschiedener Anlagen

Die Bezeichnung der Anlagen ist in Tabelle 8, Abschnitt 3.5 im Hauptteil ersichtlich.

Sequenzen (gesamt): 151.647

Sequenzen pro Probe (min.): 2.644

Sequenzen pro Probe (max.): 14.666

Median: 11.695

Mittel: 10.110

Bezeichnung	Gezählte Sequenzen
1	2644
2	12866
3	11759
4	11695
5	5707
6	11824
7	14666
8	12474
9	3165
10	11552

11	11691
12	12486
13	5474
14	10915
15	12729

Tabelle A 3: Rarefaction, OTUs und Diversität – NGS verschiedener Anlagen

Die Bezeichnung der Anlagen ist in Tabelle 8, Abschnitt 3.5 im Hauptteil ersichtlich.

Anlagen- bezeichnung	Tiefe (Sequenzen)	\bar{x} OTU (n=10)	Standardab- weichung OTU	\bar{x} Shannon Diversität (n=10)	Standardab- weichung Shannon Diversität
1	1	1	0,00	0,0	0,00
1	294	44	1,83	4,5	0,12
1	588	50,6	1,51	4,6	0,06
1	882	52,5	0,85	4,6	0,05
1	1175	53,2	0,63	4,6	0,03
1	1469	53,3	0,67	4,6	0,02
1	1763	54	0,00	4,6	0,02
1	2056	54	0,00	4,6	0,02
1	2350	53,9	0,32	4,6	0,01
1	2644	54	0,00	4,6	0,00
2	1	1	0,00	0,0	0,00
2	294	99,3	3,30	5,8	0,09

2	588	133,3	4,03	6,0	0,07
2	882	151,4	4,03	6,1	0,08
2	1175	167,2	5,85	6,2	0,06
2	1469	172	3,30	6,2	0,04
2	1763	181,8	5,01	6,2	0,06
2	2056	185,6	4,99	6,2	0,04
2	2350	192,8	3,19	6,2	0,04
2	2644	194,1	2,85	6,2	0,02
3	1	1	0,00	0,0	0,00
3	294	61	2,98	4,6	0,10
3	588	80,5	3,81	4,8	0,10
3	882	91,8	3,61	4,8	0,06
3	1175	99,8	4,52	4,8	0,05
3	1469	104,8	2,20	4,9	0,07
3	1763	107,8	2,57	4,8	0,05
3	2056	109,4	3,10	4,8	0,06
3	2350	111,7	2,31	4,8	0,03
3	2644	113,3	3,13	4,8	0,04
4	1	1	0,00	0,0	0,00
4	294	98,6	5,82	5,7	0,12
4	588	138,8	5,45	5,9	0,07
4	882	160,5	5,48	6,1	0,07
4	1175	179,2	3,94	6,1	0,07

4	1469	183,3	4,57	6,1	0,05
4	1763	189,5	3,50	6,2	0,03
4	2056	198,3	2,41	6,2	0,03
4	2350	200,8	3,68	6,2	0,03
4	2644	203	3,94	6,2	0,03
5	1	1	0,00	0,0	0,00
5	294	52,9	2,85	4,7	0,14
5	588	63	1,83	4,8	0,04
5	882	67	2,00	4,8	0,06
5	1175	69,6	1,07	4,8	0,05
5	1469	71,3	1,70	4,8	0,03
5	1763	72,5	1,18	4,8	0,03
5	2056	72,5	1,27	4,8	0,03
5	2350	73,4	0,52	4,9	0,04
5	2644	73,3	0,82	4,8	0,03
6	1	1	0,00	0,0	0,00
6	294	96,3	4,22	5,8	0,09
6	588	130,1	2,81	6,0	0,06
6	882	145,7	5,14	6,0	0,05
6	1175	159,1	3,45	6,1	0,03
6	1469	168	1,89	6,2	0,04
6	1763	171,7	3,86	6,1	0,06
6	2056	178,4	2,88	6,2	0,06

6	2350	181,7	3,13	6,2	0,04
6	2644	182,8	3,16	6,2	0,04
7	1	1	0,00	0,0	0,00
7	294	89	2,26	5,5	0,14
7	588	119,7	5,31	5,7	0,09
7	882	136,2	3,85	5,7	0,07
7	1175	149,6	5,25	5,8	0,08
7	1469	159,3	3,09	5,8	0,04
7	1763	163,8	4,78	5,8	0,06
7	2056	171,3	2,50	5,8	0,03
7	2350	176,7	3,77	5,9	0,04
7	2644	178,3	4,08	5,8	0,04
8	1	1	0,00	0,0	0,00
8	294	43,2	2,66	3,7	0,11
8	588	57,4	3,89	3,9	0,10
8	882	63	3,46	3,8	0,08
8	1175	69,7	2,06	3,9	0,08
8	1469	73	2,00	3,9	0,04
8	1763	75	2,54	3,9	0,05
8	2056	77,4	2,17	3,9	0,06
8	2350	78,6	1,65	3,9	0,06
8	2644	79,7	2,21	3,9	0,05
9	1	1	0,00	0,0	0,00

9	294	42,9	1,91	4,1	0,11
9	588	49,4	1,51	4,2	0,07
9	882	51,3	1,34	4,2	0,07
9	1175	52,2	0,63	4,2	0,04
9	1469	53	0,00	4,2	0,05
9	1763	52,9	0,32	4,2	0,03
9	2056	52,9	0,32	4,2	0,03
9	2350	53	0,00	4,2	0,02
9	2644	53	0,00	4,2	0,02
10	1	1	0,00	0,0	0,00
10	294	106,2	4,26	6,1	0,10
10	588	143,1	7,22	6,3	0,10
10	882	163,4	3,78	6,4	0,06
10	1175	175,7	4,24	6,4	0,06
10	1469	185,6	2,55	6,5	0,04
10	1763	191,2	4,66	6,5	0,03
10	2056	194,1	4,33	6,5	0,05
10	2350	198,5	3,78	6,5	0,03
10	2644	202,9	2,02	6,5	0,04
11	1	1	0,00	0,0	0,00
11	294	48,6	3,10	4,2	0,12
11	588	64,5	2,88	4,3	0,13
11	882	71,6	2,99	4,3	0,06

11	1175	76,1	2,38	4,4	0,08
11	1469	77,1	1,85	4,3	0,07
11	1763	80,6	1,90	4,4	0,04
11	2056	82,3	1,77	4,3	0,03
11	2350	84,1	2,28	4,4	0,05
11	2644	85	1,63	4,4	0,03
12	1	1	0,00	0,0	0,00
12	294	83,9	5,67	5,5	0,10
12	588	110,1	4,82	5,6	0,06
12	882	127	4,50	5,7	0,06
12	1175	137,9	2,85	5,7	0,04
12	1469	146	2,67	5,8	0,03
12	1763	152,5	3,41	5,8	0,04
12	2056	154,7	3,33	5,8	0,05
12	2350	156,9	4,25	5,8	0,06
12	2644	160,1	3,75	5,8	0,05
13	1	1	0,00	0,0	0,00
13	294	52,1	4,12	4,7	0,06
13	588	65,4	3,44	4,8	0,08
13	882	72,9	1,97	4,9	0,03
13	1175	75,8	1,93	4,9	0,07
13	1469	77,7	1,70	4,9	0,04
13	1763	78,6	0,97	4,9	0,03

13	2056	79,6	1,35	4,9	0,05
13	2350	79,7	0,95	4,9	0,03
13	2644	80,4	0,70	4,9	0,01
14	1	1	0,00	0,0	0,00
14	294	70,8	3,94	5,2	0,11
14	588	87,9	4,68	5,3	0,07
14	882	100,2	2,94	5,4	0,06
14	1175	107,8	1,87	5,4	0,06
14	1469	112,7	2,95	5,4	0,04
14	1763	114,9	1,97	5,4	0,07
14	2056	118	2,11	5,4	0,04
14	2350	119,2	2,10	5,4	0,04
14	2644	121,5	2,37	5,4	0,03
15	1	1	0,00	0,0	0,00
15	294	84,2	3,43	5,4	0,10
15	588	112,4	3,20	5,6	0,05
15	882	132,2	4,34	5,7	0,05
15	1175	139,9	3,93	5,7	0,06
15	1469	145,6	3,66	5,7	0,05
15	1763	152,4	4,70	5,7	0,06
15	2056	155,2	3,94	5,7	0,04
15	2350	160,2	2,82	5,8	0,04
15	2644	164,5	1,35	5,8	0,03

Tabelle A 4: ANOSIM zur Anlaufphase (methanogene Archaeen)

Sample statistic (Global R): 0,438

Significance level of sample statistic: 0,01 %

Number of permutations: 10000 (Random sample from a large number)

Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0

Paarweiser Test

Gruppen	R statistisch	Signifikanz Level	Mögliche Permutationen	Tatsächliche Permutationen	Erfasste Anzahl
Start1, NV1	0,317	3,3	276	276	9
Start1, Ferm1	0,763	1,7	231	231	4
Start1, Ferm2	1	1,5	66	66	1
Start1, NV2	0,861	1,5	66	66	1
Start1, Ferm3	1	1,1	91	91	1
Start1, NV3	1	1,1	91	91	1
NV1, Ferm1	0,259	0,04	Sehr groß	10000	3
NV1, Ferm2	0,309	0,05	64512240	10000	4
NV1, NV2	0,305	0,1	64512240	10000	10
NV1, Ferm3	0,621	0,01	548354040	10000	0
NV1, NV3	0,678	0,01	548354040	10000	0
Ferm1, Ferm2	0,526	0,01	30045015	10000	0
Ferm1, NV2	0,439	0,03	30045015	10000	2
Ferm1, Ferm3	0,531	0,01	225792840	10000	0
Ferm1, NV3	0,576	0,01	225792840	10000	0
Ferm2, NV2	0,049	18,7	92378	10000	1871
Ferm2, Ferm3	0,522	0,01	646646	10000	0

Ferm2, NV3	0,743	0,01	646646	10000	0
NV2, Ferm3	0,403	0,02	646646	10000	1
NV2, NV3	0,496	0,02	646646	10000	1
Ferm3, NV3	0,014	29,4	1352078	10000	2935

Tabelle A 5: ANOSIM zur Anlaufphase (Bakterien)

Sample statistic (Global R): 0,26

Significance level of sample statistic: 0,01%

Number of permutations: 10000 (Random sample from a large number)

Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0

Paarweiser Test

Gruppen	R statistisch	Signifikanz Level %	Mögliche Permutationen	Tatsächliche Permutationen	Erfasste Anzahl
Start1, NV1	0,104	23,6	276	276	65
Start1, Ferm1	0,432	6,5	231	231	15
Start1, Ferm2	1	1,5	66	66	1
Start1, NV2	0,867	1,5	66	66	1
Start1, Ferm3	0,705	1,1	91	91	1
Start1, NV3	0,754	1,1	91	91	1
NV1, Ferm1	0,122	0,6	Sehr groß	10000	62
NV1, Ferm2	0,152	4,1	64512240	10000	414
NV1, NV2	0,13	6,3	64512240	10000	630
NV1, Ferm3	0,469	0,01	548354040	10000	0
NV1, NV3	0,475	0,01	548354040	10000	0
Ferm1, Ferm2	0,158	3,2	30045015	10000	320

Ferm1, NV2	0,151	4	30045015	10000	395
Ferm1, Ferm3	0,338	0,02	225792840	10000	1
Ferm1, NV3	0,425	0,01	225792840	10000	0
Ferm2, NV2	0,216	1,6	92378	10000	158
Ferm2, Ferm3	0,457	0,01	646646	10000	0
Ferm2, NV3	0,451	0,01	646646	10000	0
NV2, Ferm3	0,355	0,1	646646	10000	12
NV2, NV3	0,306	0,5	646646	10000	46
Ferm3, NV3	0,027	24,5	1352078	10000	2454

Tabelle A 6: Anzahl Sequenzen - NGS Anlaufphase

Die Bezeichnung der Proben ist in Abschnitt 4.3 im Hauptteil beschrieben.

Sequenzen (gesamt): 648.974

Sequenzen pro Probe (min.): 23.051

Sequenzen pro Probe (max.): 71.688

Median: 61.141,5

Mittel: 54.081

Bezeichnung	Gezählte Sequenzen
F30	23051
F37	60387
F50	50179
F178	67799
F192	30901
F206	61903
P30	71688
P37	65701

P50	30901
P178	67799
P206	68281

Tabelle A 7: Rarefaction, OTUs und Diversität – NGS Anlaufphase

Die Bezeichnung der Proben ist in Abschnitt 4.3 im Hauptteil beschrieben.

Bezeichnung	Sequenzen	\bar{x} OTUs (n=10)	Phylogenetische Diversität (PD whole tree)	Chao1
F30	10	9,2	2,883	34,700
F30	2314	466,8	43,142	1269,099
F30	4618	730,2	56,762	2084,559
F30	6922	931,9	65,522	2455,060
F30	9226	1128,3	73,489	3103,240
F30	11530	1310,8	81,185	3586,380
F30	13834	1467,9	87,020	3865,438
F30	16138	1633,1	93,646	4116,418
F30	18442	1764,7	97,987	4280,598
F30	20746	1903,3	102,618	4579,094
F30	23050	2027,0	106,870	4710,435
F37	10	9,2	2,977	37,000
F37	2314	590,5	50,082	1855,897
F37	4618	940,7	66,982	2937,973
F37	6922	1249,3	79,673	3681,708

F37	9226	1509,4	90,400	4318,978
F37	11530	1761,6	100,242	4994,458
F37	13834	1972,8	107,040	5347,231
F37	16138	2195,1	115,514	6022,288
F37	18442	2389,8	121,450	6210,780
F37	20746	2585,4	128,976	6785,674
F37	23050	2761,2	134,753	6918,230
F50	10	9,2	2,961	37,600
F50	2314	555,6	47,931	1583,161
F50	4618	872,2	63,723	2593,658
F50	6922	1146,0	75,187	3329,230
F50	9226	1376,7	84,771	4007,737
F50	11530	1606,3	93,044	4500,256
F50	13834	1785,3	100,513	4718,851
F50	16138	1986,9	107,420	5288,978
F50	18442	2163,6	113,883	5709,053
F50	20746	2343,9	120,406	6144,363
F50	23050	2506,1	125,543	6411,308
F178	10	8,7	2,985	28,800
F178	2314	445,6	39,442	1205,092
F178	4618	697,5	51,459	1973,113
F178	6922	903,3	60,345	2528,463
F178	9226	1081,6	68,240	3018,695

F178	11530	1237,7	74,729	3379,933
F178	13834	1397,1	80,916	3690,151
F178	16138	1546,1	86,590	4134,252
F178	18442	1681,6	91,097	4403,726
F178	20746	1833,7	97,099	4795,329
F178	23050	1940,2	100,393	4903,828
F192	10	8,9	2,276	34,300
F192	2314	543,5	43,043	1754,252
F192	4618	875,9	58,757	2470,540
F192	6922	1126,6	68,726	3084,892
F192	9226	1385,2	78,704	3722,559
F192	11530	1600,1	86,156	4258,762
F192	13834	1810,2	94,173	4728,930
F192	16138	1995,2	100,838	5224,906
F192	18442	2160,0	106,885	5565,727
F192	20746	2324,9	112,114	5931,852
F192	23050	2482,0	117,639	6187,823
F206	10	8,1	2,101	28,600
F206	2314	455,4	38,405	1338,876
F206	4618	728,5	50,996	2162,727
F206	6922	948,3	60,064	2600,616
F206	9226	1160,4	69,513	3194,060
F206	11530	1304,4	75,188	3522,322

F206	13834	1486,5	81,830	4016,897
F206	16138	1620,2	86,357	4142,981
F206	18442	1784,1	92,613	4612,204
F206	20746	1930,1	97,994	4960,902
F206	23050	2053,3	102,445	5275,537
P30	10	8,5	2,960	26,450
P30	2314	545,7	47,326	1806,803
P30	4618	883,1	64,610	2653,209
P30	6922	1151,7	76,128	3250,411
P30	9226	1405,7	86,985	3958,140
P30	11530	1643,9	95,738	4691,784
P30	13834	1851,0	103,243	4987,977
P30	16138	2047,9	110,531	5663,342
P30	18442	2227,2	116,718	5796,042
P30	20746	2387,6	122,731	6150,762
P30	23050	2583,8	129,349	6536,013
P37	10	8,8	2,582	27,600
P37	2314	568,9	49,250	1665,599
P37	4618	890,2	64,773	2680,554
P37	6922	1192,2	77,089	3402,925
P37	9226	1429,3	87,588	4024,021
P37	11530	1667,0	95,840	4683,481
P37	13834	1877,6	103,316	5119,158

P37	16138	2079,8	111,316	5540,985
P37	18442	2240,8	116,235	5857,235
P37	20746	2446,3	123,813	6435,202
P37	23050	2621,0	129,242	6879,259
P50	10	8,4	2,301	25,900
P50	2314	574,6	47,981	1766,564
P50	4618	915,4	64,346	2773,326
P50	6922	1210,6	76,824	3581,748
P50	9226	1477,5	87,178	4194,450
P50	11530	1722,8	97,294	4783,873
P50	13834	1924,6	103,504	5213,070
P50	16138	2148,0	111,826	5812,153
P50	18442	2328,2	117,720	6207,867
P50	20746	2507,0	123,819	6572,454
P50	23050	2688,3	129,399	6889,099
P178	10	7,9	2,864	18,550
P178	2314	438,1	38,565	1166,385
P178	4618	703,7	51,232	1895,203
P178	6922	917,2	60,804	2485,381
P178	9226	1103,5	68,490	2860,178
P178	11530	1278,8	75,321	3398,873
P178	13834	1435,3	81,335	3866,959
P178	16138	1588,2	86,788	4100,698

P178	18442	1727,6	92,179	4433,768
P178	20746	1875,8	97,229	4853,763
P178	23050	1984,2	100,589	4929,198
P192	10	8,4	2,338	28,100
P192	2314	466,0	38,789	1305,293
P192	4618	734,3	51,215	1989,307
P192	6922	959,6	60,551	2582,559
P192	9226	1139,5	67,323	2975,046
P192	11530	1318,1	73,880	3309,714
P192	13834	1467,1	79,235	3665,486
P192	16138	1641,3	85,405	4219,081
P192	18442	1786,2	90,189	4482,697
P192	20746	1919,9	94,833	4795,898
P192	23050	2047,1	98,700	5015,970
P206	10	7,6	2,368	23,500
P206	2314	431,3	36,778	1274,349
P206	4618	686,2	47,854	1968,253
P206	6922	910,7	57,463	2503,318
P206	9226	1083,3	64,188	2768,467
P206	11530	1249,7	71,283	3335,599
P206	13834	1411,0	77,094	3673,472
P206	16138	1563,9	82,269	3923,866
P206	18442	1709,6	88,212	4305,023

P206	20746	1829,3	91,877	4732,809
P206	23050	1955,1	95,940	4942,916

Tabelle A 8: ANOSIM zur Trockenfermentation (methanogene Archaeen)

Die Bezeichnung der Phasen ist in Abschnitt 4.4 im Hauptteil beschrieben.

Tests for differences between ordered Dist. groups

Global Test

Sample statistic (R): 0,409

Significance level of sample statistic: 0,2 %

Number of permutations: 999 (Random sample from 25225200)

Number of permuted statistics greater than or equal to R: 1

Paarweiser

Test

	R	Signifikanz	Mögliche	Tatsächliche	Erfasste
	statistisch	Level %	Permutationen	Permutationen	Anzahl
P, 1	0,464	20	15	15	3
P, 2	1	6,7	15	15	1
P, 3	0,469	7,1	28	28	2
1, 2	0,604	5,7	35	35	2
1, 3	0,083	29,5	210	210	62
2, 3	-0,167	90,5	210	210	190

Tabelle A 9: ANOSIM zur Trockenfermentation (Bakterien)

Die Bezeichnung der Phasen ist in Abschnitt 4.4 im Hauptteil beschrieben.

Tests for differences between ordered Dist. groups

Global Test

Sample statistic (R): 0,042

Significance level of sample statistic: 32,9 %

Number of permutations: 999 (Random sample from 30270240)

Number of permuted statistics greater than or equal to R: 328

Paarweiser

Test

Gruppen	R	Signifikanz	Mögliche	Tatsächliche	Erfasste
	statistisch	Level %	Permutationen	Permutationen	Anzahl
P, 1	0	40	15	15	6
P, 2	0,164	38,1	21	21	8
P, 3	0,691	4,8	21	21	1
1, 2	0,075	65,9	126	126	83
1, 3	0,038	31	126	126	39
2, 3	0,008	47,6	126	126	60

Tabelle A 10: pH-Wert und VFA-Konzentrationen bei der Flexibilisierung

t [d]	pH-Wert	Essigs. [mg L ⁻¹]	Prop. [mg L ⁻¹]	i-Butter [mg L ⁻¹]	n-Butter [mg L ⁻¹]	i-Valerian [mg L ⁻¹]	n- Valerian [mg L ⁻¹]
304	7,76	0	0	0	0	0	0
311	7,87	500	0	0	0	0	0
318	7,82	0	0	0	0	0	0
322	7,08	1269	769	41	868	51	52
325	7,75	0	0	0	0	0	0
332	7,77	0	0	0	0	0	0

338	7,53	0	0	0	0	0	0
346	7,61	0	0	0	0	0	0
365	7,59	0	0	0	0	0	0
374	7,62	0	0	0	0	0	0
381	7,64	0	0	0	0	0	0
388	7,6	0	0	0	0	0	0
395	7,7	0	0	0	0	0	0
402	7,6	0	0	0	0	0	0
409	7,6	0	0	0	0	0	0
416	7,7	0	0	0	0	0	0
423	7,7	150	0	0	0	0	0
430	7,6	0	0	0	0	0	0
437	7,5	0	0	0	0	0	0
451	7,7	0	0	0	0	0	0
458	7,8	0	0	0	0	0	0
465	7,8	0	0	0	0	0	0
472	7,9	0	0	0	0	0	0
479	7,8	0	0	0	0	0	0
485	7,9	0	0	0	0	0	0
493	7,9	0	0	0	0	0	0
499	7,9	0	0	0	0	0	0
506	7,6	399	1509	0	0	0	0
514	7,8	0	0	0	0	0	0

521	7,7	173	97	0	0	0	0
528	7,8	0	0	0	0	0	0
542	7,7	0	0	0	0	0	0
556	7,9	0	0	0	0	0	0
563	7,8	0	0	0	0	0	0
577	7,9	188	0	0	0	0	0
598	7,7	302	0	0	0	0	0
612	7,9	0	0	0	0	0	0
626	7,8	227	0	0	0	0	0
639	7,8	0	0	0	0	0	0
647	7,9	0	0	0	0	0	0
652	7,5	1301	291	0	108	0	0
653	7,8	831	448	0	0	0	0
654	7,8	120	155	0	0	0	0
655	7,9	0	0	0	0	0	0
658	7,9	0	0	0	0	0	0
659	7,6	713	182	0	0	0	0
660	7,8	192	72	0	0	0	0
661	7,8	167	60	0	0	0	0
665	7,9	144	0	0	0	0	0
666	7,6	683	174	0	0	0	0
667	7,9	0	0	0	0	0	0
668	7,8	72	0	0	0	0	0

669	7,8	0	0	0	0	0	0
672	7,8	0	0	0	0	0	0
673	7,6	810	203	0	0	0	0
674	7,8	114	0	0	0	0	0
675	7,9	0	0	0	0	0	0
676	7,8	0	0	0	0	0	0
679	7,8	0	0	0	0	0	0
680	7,5	599	117	0	0	0	0
681	7,8	120	0	0	0	0	0
682	7,8	0	0	0	0	0	0
687	7,6	590	115	0	0	0	0
688	7,8	82	0	0	0	0	0
694	7,6	576	118	0	0	0	0
695	7,8	0	0	0	0	0	0
696	7,8	0	0	0	0	0	0
701	7,6	501	118	0	0	0	0
702	7,7	0	0	0	0	0	0
707	7,7	0	0	0	0	0	0
731	7,7	0	0	0	0	0	0
736	7,5	1319	402	0	0	0	0
737	7,7	1007	384	0	0	0	0
738	7,9	0	0	0	0	0	0
742	7,8	0	0	0	0	0	0

743	7,6	850	307	0	0	0	0
744	7,8	280	60	0	0	0	0
745	7,8	0	0	0	0	0	0
750	7,5	824	240	0	0	0	0
751	7,8	0	0	0	0	0	0
752	7,8	0	0	0	0	0	0
757	7,6	334	0	0	0	0	0
758	7,7	70	0	0	0	0	0
759	7,8	0	0	0	0	0	0
765	7,6	207	54	0	0	0	0
766	7,8	240	119	0	0	0	0
767	7,8	0	0	0	0	0	0
770	7,9	111	0	0	0	0	0
771	7,4	1733	659	56	82	53	0
772	7,8	555	583	85	0	89	0
773	7,9	83	0	0	0	0	0
774	7,9	0	0	0	0	0	0
777	7,8	0	0	0	0	0	0
780	7,4	2111	514	55	95	54	0
785	7,9	0	0	0	0	0	0
792	7,8	0	0	0	0	0	0
793	7,8	411	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
794	7,7	138	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50

795	7,8	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
799	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
800	7,6	102	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
801	7,8	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
807	7,7	114	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
808	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
813	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
814	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
815	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
820	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
821	7,5	269	98	< 50	< 50	< 50	< 50
822	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
827	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
828	7,5	68	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
829	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
834	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
836	7,5	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
841	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
848	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
849	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
857	7,7	92	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
864	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
878	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50

891	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
906	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
920	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
927	7,5	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
934	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
948	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
962	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
976	7,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
990	7,5	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
997	7,5	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
1004	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
1011	7,7	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
1018	7,8	231	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50

Tabelle A 11: Anzahl Sequenzen – NGS Flexibilisierung

Die Bezeichnung der Proben ist in Abschnitt 4.5.2 im Hauptteil beschrieben.

Gesamte Sequenzen: 275,897

Sequenzen pro Probe (min): 5,976

Sequenzen pro Probe (max): 27,519

Median: 17,388

Mittel: 16,229

Bezeichnung	Gezählte Sequenzen
311	18743
318	23499
325	12022
365	14886

437	27519
465	20239
521	8262
542	13737
612	21543
654	20214
707	7721
731	13775
794	17388
834	19704
878	5976
891	8552
997	22117

Tabelle A 12: Rarefaction, OTUs und Diversität – NGS Flexibilisierung

Die Bezeichnung der Proben ist in Abschnitt 4.5.2 im Hauptteil beschrieben.

Bezeichnung	Tiefe (Sequenzen)	\bar{x} OTU (n=10)	Standardab- weichung OTU	\bar{x} Shannon Diversität (n=10)	Standardab- weichung Shannon Diversität
311	1	1	0,00	0,0	0,00
311	664	107,5	4,14	5,0	0,10
311	1328	130	3,77	5,0	0,06
311	1992	141,3	3,40	5,1	0,06

311	2656	148,1	2,70	5,1	0,04
311	3320	151,7	2,21	5,1	0,03
311	3984	153,8	2,70	5,1	0,03
311	4648	156,7	2,58	5,1	0,02
311	5312	157,9	1,91	5,1	0,02
311	5976	158,3	1,77	5,1	0,02
318	1	1	0,00	0,0	0,00
318	664	115,8	4,21	4,7	0,08
318	1328	145,3	3,53	4,8	0,07
318	1992	158,6	3,69	4,8	0,06
318	2656	169,3	2,69	4,8	0,05
318	3320	174,1	3,03	4,8	0,05
318	3984	177,7	2,26	4,8	0,05
318	4648	180,3	2,54	4,8	0,04
318	5312	183,5	1,58	4,9	0,03
318	5976	186,1	1,79	4,8	0,02
325	1	1	0,00	0,0	0,00
325	664	96,7	4,90	4,8	0,10
325	1328	113,4	2,91	4,9	0,06
325	1992	120	4,14	4,9	0,04
325	2656	123,9	2,07	4,9	0,03
325	3320	124,7	1,57	4,9	0,07
325	3984	125,6	1,07	4,9	0,04

325	4648	126,1	0,99	4,9	0,02
325	5312	125,9	0,88	4,9	0,04
325	5976	126,7	0,48	4,9	0,02
365	1	1	0,00	0,0	0,00
365	664	82,5	2,68	3,8	0,12
365	1328	102,8	3,77	3,9	0,09
365	1992	107,2	3,97	3,9	0,04
365	2656	113,8	2,40	3,9	0,04
365	3320	117,7	1,49	3,9	0,06
365	3984	119,2	1,93	4,0	0,06
365	4648	121,5	1,35	4,0	0,03
365	5312	120,4	1,07	4,0	0,04
365	5976	121,6	1,07	4,0	0,05
437	1	1	0,00	0,0	0,00
437	664	97,3	6,77	4,3	0,12
437	1328	127,5	7,26	4,4	0,09
437	1992	145,2	3,08	4,4	0,07
437	2656	154,2	5,02	4,5	0,06
437	3320	164,2	2,44	4,5	0,05
437	3984	167,3	3,40	4,5	0,05
437	4648	170,6	1,96	4,4	0,03
437	5312	174,3	3,37	4,5	0,02
437	5976	177,5	3,31	4,5	0,02

465	1	1	0,00	0,0	0,00
465	664	103,8	6,81	4,7	0,12
465	1328	132,7	3,59	4,8	0,08
465	1992	146,8	4,66	4,8	0,03
465	2656	150,9	2,34	4,8	0,03
465	3320	159,5	2,27	4,8	0,05
465	3984	162,4	1,90	4,8	0,04
465	4648	164,5	2,32	4,9	0,03
465	5312	166,3	1,77	4,9	0,03
465	5976	168,2	1,81	4,9	0,04
521	1	1	0,00	0,0	0,00
521	664	69,4	3,44	3,9	0,10
521	1328	78,1	1,97	3,9	0,06
521	1992	83,2	1,93	4,0	0,04
521	2656	84,8	1,33	3,9	0,03
521	3320	86	1,05	3,9	0,03
521	3984	86,3	0,95	4,0	0,03
521	4648	86,9	0,32	4,0	0,02
521	5312	86,9	0,32	4,0	0,01
521	5976	87	0,00	4,0	0,02
542	1	1	0,00	0,0	0,00
542	664	136	5,03	6,0	0,09
542	1328	164,7	2,21	6,2	0,05

542	1992	175,9	3,45	6,2	0,03
542	2656	183,8	1,54	6,2	0,02
542	3320	186	2,16	6,2	0,02
542	3984	190,1	1,73	6,2	0,03
542	4648	190,8	1,48	6,2	0,02
542	5312	192,2	1,40	6,2	0,02
542	5976	191,9	1,10	6,2	0,03
612	1	1	0,00	0,0	0,00
612	664	106,5	4,81	5,2	0,09
612	1328	130,6	2,95	5,2	0,06
612	1992	143,8	1,87	5,3	0,07
612	2656	149,9	3,05	5,3	0,03
612	3320	153,8	2,04	5,3	0,02
612	3984	157,3	2,11	5,3	0,04
612	4648	158,6	1,26	5,3	0,03
612	5312	158,5	1,51	5,3	0,03
612	5976	159,9	1,66	5,3	0,02
654	1	1	0,00	0,0	0,00
654	664	108,7	3,27	5,7	0,06
654	1328	132,3	2,21	5,8	0,06
654	1992	146,4	3,53	5,8	0,05
654	2656	152,8	2,18	5,8	0,03
654	3320	157,3	3,06	5,8	0,03

654	3984	160,3	2,26	5,8	0,04
654	4648	160,9	3,07	5,8	0,02
654	5312	164,7	1,57	5,8	0,03
654	5976	166,1	1,29	5,8	0,02
707	1	1	0,00	0,0	0,00
707	664	80,8	2,62	5,0	0,08
707	1328	90,9	1,97	5,1	0,04
707	1992	94,4	0,97	5,1	0,06
707	2656	96	1,26	5,1	0,02
707	3320	96,9	0,74	5,2	0,03
707	3984	97,9	0,32	5,1	0,03
707	4648	97,8	0,42	5,2	0,02
707	5312	97,9	0,32	5,2	0,01
707	5976	98	0,00	5,2	0,01
731	1	1	0,00	0,0	0,00
731	664	96,8	2,94	5,2	0,07
731	1328	115	5,12	5,3	0,07
731	1992	124	2,91	5,4	0,03
731	2656	128,1	2,74	5,4	0,04
731	3320	131,3	1,42	5,4	0,05
731	3984	132,8	1,14	5,4	0,04
731	4648	133,2	1,23	5,4	0,03
731	5312	133,9	0,99	5,4	0,03

731	5976	134,1	1,10	5,4	0,01
794	1	1	0,00	0,0	0,00
794	664	136,3	4,85	6,0	0,04
794	1328	168,7	4,97	6,1	0,03
794	1992	185,1	5,30	6,1	0,06
794	2656	199	3,38	6,2	0,04
794	3320	201,8	2,49	6,2	0,03
794	3984	207,9	2,73	6,2	0,03
794	4648	210,8	1,62	6,2	0,03
794	5312	211,6	2,01	6,2	0,03
794	5976	214,1	1,73	6,2	0,02
834	1	1	0,00	0,0	0,00
834	664	125,8	6,11	5,7	0,09
834	1328	159,1	5,59	5,8	0,05
834	1992	174,5	5,85	5,9	0,04
834	2656	183,6	2,33	5,9	0,05
834	3320	188,9	3,00	5,9	0,05
834	3984	194,7	2,00	5,9	0,03
834	4648	196,6	2,46	5,9	0,02
834	5312	199,2	2,57	5,9	0,02
834	5976	200,8	2,10	5,9	0,02
878	1	1	0,00	0,0	0,00
878	664	75,7	2,45	4,8	0,08

878	1328	84,1	1,45	4,9	0,06
878	1992	85,9	0,99	4,9	0,02
878	2656	86,6	0,49	4,9	0,03
878	3320	87	0,00	4,9	0,02
878	3984	86,9	0,32	4,9	0,03
878	4648	87	0,00	4,9	0,02
878	5312	87	0,00	4,9	0,01
878	5976	87	0,00	4,9	0,00
891	1	1	0,00	0,0	0,00
891	664	95,2	4,64	5,2	0,05
891	1328	110,4	2,99	5,3	0,04
891	1992	116,3	2,00	5,3	0,02
891	2656	120,4	1,62	5,3	0,04
891	3320	121,4	0,97	5,3	0,01
891	3984	122,4	0,70	5,3	0,02
891	4648	122,9	1,10	5,3	0,02
891	5312	123,6	0,70	5,3	0,03
891	5976	123,8	0,42	5,3	0,01
997	1	1	0,00	0,0	0,00
997	664	141,4	5,95	6,0	0,06
997	1328	178,1	4,61	6,1	0,08
997	1992	198,5	3,14	6,1	0,03
997	2656	209,2	2,71	6,2	0,01

997	3320	215,3	5,01	6,2	0,04
997	3984	219,9	2,88	6,2	0,04
997	4648	224,3	2,00	6,2	0,03
997	5312	227,8	2,39	6,2	0,02
997	5976	229,9	2,02	6,2	0,02

Tabelle A 13: Elementanalyse

Elementkonzentrationen in den untersuchten Anlagen (1-15). Die jeweiligen Konzentrationen der Elemente sind in mg kg⁻¹TS angegeben.

Anlage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15
Cr	5,6	6,8	12,6	7,9	3,8	6,7	3,2	2,6	5,4	2,9	3,9	8,6	56,7	85,4
Co	1,8	1,4	1,8	5,0	5,3	1,0	1,7	2,8	2,1	0,8	1,4	2,5	6,7	8,9
Ni	5,0	6,8	12,0	26,4	9,9	2,8	11,6	4,6	8,3	3,8	4,6	16,3	24,2	47,7
Se	1,4	< D.L.	0,8	< D.L.	7,6	0,9	0,3	2,9	8,6	2,4	5,3	1,2	0,8	3,0
Rb	46,9	55,6	44,3	119,0	17,4	18,5	31,4	22,4	52,6	16,1	22,3	57,1	15,3	17,7
Sr	79,2	53,9	85,6	39,7	29,0	32,3	37,0	25,9	80,5	13,2	29,8	68,3	128,5	73,3
As	1,2	1,5	2,7	2,6	2,3	1,1	2,4	1,4	2,6	1,4	2,7	3,7	13,8	20,6
Mo	7,3	3,7	3,3	6,7	2,1	1,2	3,5	2,9	1,9	1,7	1,9	4,6	6,3	6,3
Cd	0,4	0,3	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	0,5	1,4	1,2
Sb	< D.L.	0,1	< D.L.	< D.L.	-0,1	-0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	4,3	6,4
Ba	107,5	64,8	71,3	36,2	23,6	39,8	62,2	22,0	47,1	13,4	35,8	73,2	298,6	165,1
Pb	1,9	2,2	3,3	2,2	0,9	1,0	2,3	3,7	1,6	1,6	1,4	26,5	35,7	27,7
Bi	< D.L.	< D.L.	0,0	< D.L.	0,0	0,0	0,0	0,1	1,7	0,0	0,2	0,1	2,5	4,2
U	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	5,3	2,9
Mn	247,2	202,2	392,3	8,6	248,1	361,7	279,5	225,3	501,6	179,4	220,0	263,8	322,1	370,7
Cu	81,3	28,1	55,7	6,2	30,5	41,7	26,9	73,9	57,9	23,7	24,4	285,4	192,3	192,4
Zn	259,9	140,2	627,0	15,7	196,6	363,5	213,2	219,7	283,1	134,9	138,9	524,5	893,5	647,4
Al	1462,5	2414,1	2592,7	618,5	528,4	777,1	647,1	1045,3	3130,0	782,1	1234,4	2579,1	25407,4	13764,8
Fe	1952,4	2942,2	3217,1	2373,5	5190,3	1364,4	3384,2	2135,2	2484,7	2221,2	3933,1	5228,9	23877,5	31760,2

Veröffentlichungen

Weithmann, N., Weig, A. R. & Freitag, R. Process parameters and changes in the microbial community patterns during the first 240 days of an agricultural energy crop digester. *Applied microbiology and biotechnology express* 6, 53 (2016).

Weithmann, N., Möller, J.N., Löder, M.G.J., Piehl, S., Freitag, R., Laforsch, C. Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. *Science Advances* 4 (2018).

Weithmann, N., Bachmaier, S., Hilbrig, F., Planer-Friedrich, B., Weig, A. R., Freitag, R. Metal(loid) metabolism in technical biogas plants – possible consequences for resident microbiota and downstream units. In Vorbereitung.

Weithmann, N., Reuter, M., Sonnleitner, E., Weig, A. R., Freitag, R. Flexible feeding in anaerobic digestion – impact on process stability, performance and microbiota. In Vorbereitung.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....
Ort, Datum, Unterschrift